

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Antropologie a genetika člověka



Sledování buněčných populací z regresivních zubních primordií během ontogeneze.

Tracing the fate of cell populations from regressive tooth primordia during ontogenesis.

Bc. Marie Řadová

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Mária Hovořáková, Ph.D.

Praha, 2013

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 14. 8. 2013

Podpis

**Poděkování:**

Chtěla bych poděkovat své školitelce Mgr. Márii Hovořákové, Ph.D. za odborné rady, trpělivost a přátelský přístup během vedení mé diplomové práce.

Dále bych chtěla poděkovat konzultantovi Mgr. Janu Procházkovi, Ph.D. za vedení během mé zahraniční stáže a mnohé další konzultace.

Také děkuji své rodině a přátelům za podporu při celém studiu.

V neposlední řadě děkuji Hlávkově nadaci za finanční podporu mé zahraniční stáže.

# 1 Obsah

Abstrakt (v českém jazyce) .....	6
Abstract (v anglickém jazyce) .....	7
Seznam zkratek .....	8
2 Úvod .....	10
3 Literární přehled .....	12
3.1 Stavba zubu .....	12
3.2 Charakteristika dentice člověka .....	13
3.3 Prenatální vývoj dentice člověka .....	14
3.4 Postnatální vývoje lidské dentice .....	15
3.5 Obecný vývoj zubu a molekulární regulace .....	16
3.5.1 Iniciační fáze .....	18
3.5.2 Stadium zubního pupenu .....	19
3.5.3 Stadium zubního pohárku, sklovinný uzel a jeho význam .....	19
3.5.4 Stadium zubního zvonku, sekundární sklovinné uzly .....	21
3.5.5 Mineralizace zubních tkání .....	22
3.6 Rudimentární struktury a atavismy .....	23
3.7 Vývojové anomálie zubů .....	27
3.8 Kmenové buňky v oblasti zubů a jejich význam pro člověka .....	29
4 Cíl práce .....	31
5 Materiál a metody .....	33
5.1 Popis chovu a použití experimentálních myší .....	33
5.2 Značení <i>Shh</i> exprimujících buněk, histologie .....	37
5.3 Fluorescenční mikroskopie .....	37
5.3.1 Konfokální mikroskopy .....	39
5.3.2 Mikroskopické snímání a časosběrná mikroskopie .....	39

5.4	Detekce proliferace pomocí BrdU .....	41
5.5	Buněčné kultury.....	43
5.5.1	Příprava buněčných kultur .....	43
5.5.2	Kultivace .....	45
5.6	Real-time qRT PCR.....	46
5.6.1	Izolace RNA.....	46
5.6.2	Reverzní transkripce.....	47
5.6.3	Real-time qPCR .....	48
6	Výsledky .....	50
6.1	Lokalizace buněk RTSCD buněk .....	50
6.2	RTSCD buňky přetrvávají také postnatálně .....	51
6.3	V oblasti RTSCD buněk nedochází k proliferaci .....	53
6.4	Časosběrná mikroskopie.....	54
6.5	Kulivace <i>in vitro</i> .....	59
6.6	Real-time qRT PCR.....	60
7	Diskuze .....	61
7.1	Rudimentární primordia R2 a MS .....	61
7.2	Exprese genu <i>Shh</i> .....	62
7.3	Proliferace versus regrese.....	63
7.4	Vlastnosti buněčné populace RTSCD buněk .....	63
8	Závěry .....	65
9	Seznam použité literatury .....	67

## Abstrakt (v českém jazyce)

Vývoj zubního primordia u myši je důležitý model pro studium odontogeneze. U myši se během embryogeneze vyvíjí několik zubních rudimentů. Jsou to struktury, které se u jejich fylogeneticky starších příbuzných vyvíjí ve funkční zuby. Stejně tak můžeme vznik zubů z těchto zárodků iniciovat u některých myších mutantů.

V mé diplomové práci jsme se zaměřili na význam rudimentárních struktur s odontogením potenciálem u postnatálních jedinců. Jako model vývoje jsme vybrali buněčnou populaci pocházející z rudimentálního primordia MS (mesial segment), které se vyvíjí v diastemě dolní čelisti během 12,5 embryonálního dne. Pomocí inducibilní Cre-lox technologie jsme označili buňky, které jsou v tomto čase součástí signální domény tohoto primordia. Jako marker těchto buněk byl použit gen *Shh*.

Zjistili jsme, že tyto buňky dále přetrvávají jak prenatálně, tak také u postnatálních jedinců. Tuto buněčnou oblast jsme dále izolovali a testovali pomocí různých metod. Přišli jsme na to, že v buňkách postnatálního jedince se exprimují markery kmenových buněk (*Sox2*, *Bmi1*, *Gli1*) a také geny pro významné strukturní proteiny matrix skloviny: ameloblastin a amelogenin. Markery kmenových buněk se exprimují také v kultuře *in vitro* izolovaných buněk. Tato buněčná populace má tak zřejmě během dalšího života jedince nejen strukturní funkci.

Klíčová slova:

vývoj zubu, rudimentální primordium, sledování buněčných linií, kmenové buňky, Sonic hedgehog, myší embryo, časosběrná mikroskopie

## Abstract (v anglickém jazyce)

Development of tooth primordia in mice is an important model for study of odontogenesis. Several dental rudiments develop during the mouse embryogenesis. These structures develop in functional teeth in their phylogenetically older relatives. Similarly, we can initiate growth of teeth from these germs in some mutant mice.

In my diploma thesis we have focused on the importance of rudimentary structures with odontogenic potential in postnatal individuals. As a model of development, we have chosen a cell population originating from rudimentary primordia MS (mesial segment) that develops in diastema of the lower jaw during the embryonic day 12.5. Using the inducible Cre-lox technology we have marked the cells which are part of the signal domain of primordia at this time. As a marker of these cells we have used gene *Shh*.

We have found out that these cells persist prenatally and also postnatally. Further we have isolated this cell area and we have tested it using a variety of methods. We have shown that in the cells of postnatal individual are expressed markers of stem cells (*Sox2*, *Bmi1*, *Gli1*) and also genes for major enamel matrix structural proteins: ameloblastin and amelogenin. The same stem cell markers are also expressed *in vitro* culture of the isolated cells. This cell population has obviously an additional function to a structural one during the further life of an individual.

Key words:

tooth development, rudimentary primordium, lineage tracing, stem cells, Sonic hedgehog, mouse embryo, time lapse microscopy

## Seznam zkratek

BMP	Bone morphogenic protein
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridine
C	Caninus
cDNA	Complementary DNA
CFP	Cyan Fluorescent Protein
Cre	Cre recombinase
D1-D5	Disappearing rudimental primordium
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DiI	1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'- tetramethylindocarbocyanine perchlorate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Deoxyribonuklová kyselina
ED	Embryonální den
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
EGF	Epidermal Growth Factor Receptor
EMD	Enamel matrix derivative
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fetal calf serum
FGF	Fibroblast grow factor
GFP	Green Fluorescent Protein
HERS	Hertwigova epiteliální kořenová pochva
IDE	Vnitřní sklovinný epitel
iPS	Buňky indukované pluripotentní kmenové buňky
M	Molar
MEF	Mouse embryo fibroblast
MS	Mesial segment
ODE	Vnější sklovinný epitel
PBS	Phosphate buffered saline
PBT	PBS obsahující 0,1% Tween-20
pEK	Primary enamel knot
PFA	Paraformaldehyd v PBS



R1, R2	Rudimentální primordium
Real-time qRT PCR	Real-Time quantitative Reverse Transcription PCR
RFP	Red Fluorescent Protein
RNA	Ribobukleová kyselina
RPM	Revolutions per minute
RTSCD cells	Rudimentary tooth signaling center derived cells
sEK	Sekondary enamel knot
<i>Shh</i>	Sonic hedgehog
SI	Stratum intermedium
TGFβ	Transforming growth factor beta
TNF	Tumor necrosis factor
YFP	Yellow Fluorescent Protein

## 2 Úvod

Savčí dentice je systém, na kterém se díky rozdílům ve velikosti, tvaru a počtu popisují různé vývojové procesy. Čas prořezávání první stoličky, mineralizace, tvar či velikost zubů u homininů jsou jedním z hlavních kritérií charakteristiky jednotlivých druhů až k anatomicky modernímu člověku (např. Smith, 1989). Dle typu dentice je možné popsat způsob výživy, životní styl a podmínky žijících i vymřelých taxonů.

Zuby sice při ztrátě nejsou nezbytné pro další život, jejich chybění však může způsobit různé fyziologické i psychologické problémy. Proto se obvykle používají různé umělé náhrady, které se ovšem někdy neobejdou bez zdravotních komplikací. Snahou současného výzkumu je tedy vyvinout biologický materiál, který by mohl dentální tkáň plně nahradit.

Snadný přístup k zubům dnes umožňuje rozsáhlý výzkum v oblasti regenerativní medicíny a tkáňového inženýrství, včetně použití kmenových buněk (Modino a Sharpe, 2005). Kmenové buňky izolované z dentální oblasti mají nesporně velký potenciál v buněčné terapii, a to nejen v obnově tkáně zubní, ale také v regeneraci tkáně kostní či nervové (Ibarretxe et al., 2012). Zuby se tak mohou stát vhodným modelem pro kultivaci a obnovu i dalších tkání nebo orgánů.

Pro využití zubů v regenerativní medicíně je však zapotřebí velmi dobře poznat jejich vývoj a molekulární regulaci. Raný vývoj zubu je u člověka a myši prakticky stejný (Nery et al., 1970). Myši mají navíc krátkou generační dobu, umožňují pracovat s embryonálním materiálem a lze na nich využívat různé přístupy na základě molekulární genetiky (např. tvorba transgenní myši), a tak se dnes pro výzkumné účely užívá zpravidla tento zvířecí model odontogeneze. Některé lidské genetické choroby, u kterých dochází například k redukci počtu zubů, a které byly popsány i u myši, nám také slouží k pochopení komplexního procesu vývoje dentice (Thesleff, 2006; Fleischmannova et al., 2008). Odontogeneze u člověka i myši je intenzivně studována také jako obecný model vývojových procesů během organogeneze.

Základní zubní vzorec savců se skládá ze tří řezáků, jednoho špičáku, čtyř premolárů a tří molárů v každém kvadrantu horní a dolní čelisti. Na rozdíl od člověka je myši dentice značně redukována na pouhý jeden řezák a tři moláry v každém kvadrantu čelisti a pouze v jedné generaci. Oblast mezi řezáky a moláry, kde se u dospělých myši zuby nevyskytují, se nazývá diastema. Právě tato oblast je velmi vhodná pro výzkum regulace vývoje zubů,

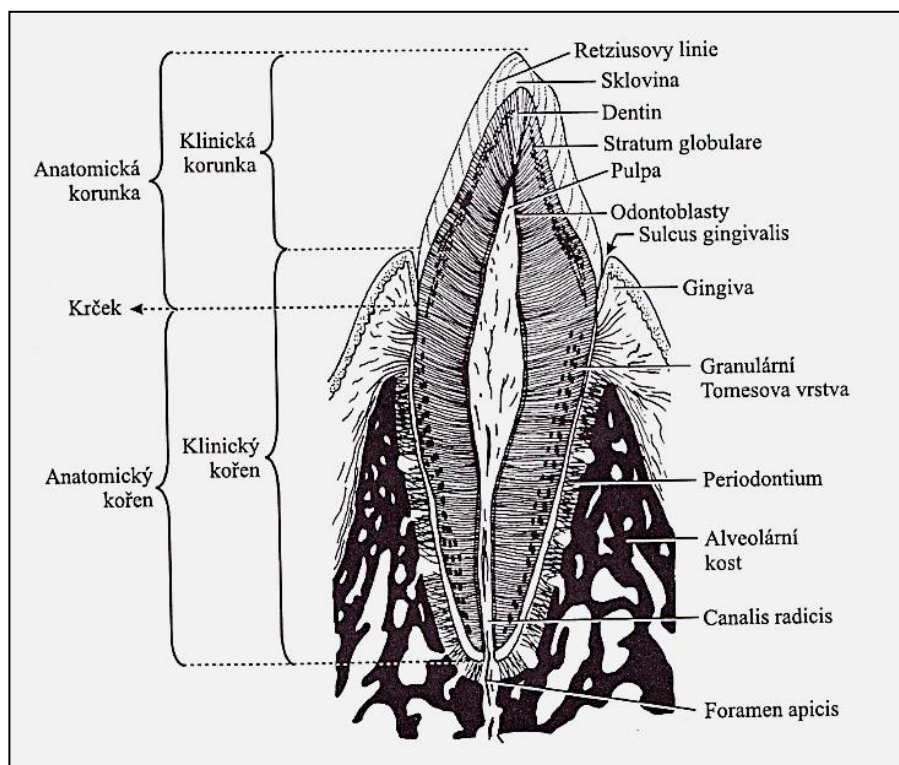
popřípadě různých defektů ve vývoji dentice. V diastemě myších embryí se totiž nachází rudimentární primordia zubů, která se během počátečních stadií embryonálního života vyvíjejí podobným způsobem jako základy funkčních zubů, ovšem dále je jejich vývoj zastaven (Peterková et al., 1996; 2000; Lesot et al., 1998). V mém diplomovém projektu jsem se zabývala právě vývojem, dalším osudem a možným významem buněčné populace, pocházející z morfogenetického pole rudimentárního primordia zubu.

## 3 Literární přehled

### 3.1 Stavba zubu

Zuby se vyvíjejí u většiny savců v oblasti horní i dolní čelisti a slouží nejen k rozmělnění potravy, ale také k obraně či se spolupodílejí na tvorbě vydávaných zvuků. Tvar i umístění zubů se mezi různými druhy liší, jejich struktura se však skládá ze **skloviny, dentinu, zubní dřeně a periodontu**. Dentici rozlišujeme podle tvaru zubů na homodontní, kde všechny zuby jsou stejného tvaru a heterodontní, tvořené morfologicky odlišnými typy zubů, tedy řezáky, špičáky, premoláry a moláry.

Zub se anatomicky rozděluje na korunku, kořen, krček a dřeňovou dutinu (viz obr. 1). Korunka je část, která vyčnívá z dásně, kořen je uložen v kostěném alveolu čelisti. Přejít mezi nimi označujeme jako krček. Největší část zubu zaujímá dentin, který je v oblasti korunky pokryt sklovinou a v oblasti kořene cementem. Uvnitř zubu je dutina, kterou vyplňuje dřeň neboli zubní pulpa. Dřeňová dutina je v korunce rozšířena a v kořeni se zmenšuje do úzkého kanálku, kudy procházejí cévy a nervy. Zub je uložen v kostěném lůžku – alveolu, se kterým je spojen periodontem.



Obr. 1. Stavba zubu (Převzato z Horký a Nováková, 2005)

**Dentin** tvoří hlavní část zubu, je měkčí než sklovina, ale tvrdší než kost. Podkládá tvrdou, ale křehkou sklovinu a chrání ji před rozdrčením. Složením je podobný kostní tkáni. Skládá se z cca 70 % anorganických, 20 % organických látek a vody. Buňky, které vytváří dentin, jsou ovšem uloženy až na vnitřním povrchu dentinu v pulpární dutině. Dentin také není zásoben cévami, ale je vyživován tenkými výběžky odontoblastů – Tomesovými vlákny. Mezi odontoblasty a dentinem se nejdříve vytváří nemineralizovaná vrstva – preentin, ze kterého vzniká dentin postupně po celý život zubu.

**Sklovina** je nejtvrdší tkání v lidském těle, obsahuje až 96 % anorganických látek, zejména hydroxyapatit. Organické látky tvoří jen 0,5 %, zejména keratin, proteiny např. amelogeniny, zbytek je voda. Sklovinu tvoří sklovinné hranoly – prizmata. Jsou to vlnovitě probíhající „hranoly“, složené z krystalů hydroxyapatitu, které do sebe zapadají, a tím přispívají k mechanické odolnosti skloviny.

Zubní **cement** je mineralizovaná tkáň, která strukturou připomíná fibrilární kost, je však stejně jako dentin bezcévná. Cement kryje krček a celý kořen zubu. Jsou v něm ukotvena Sharpeyova vlákna (periodontální ligamenta), která spojují zub s kostí alveolu.

**Zubní dřeň** je značně odlišná od předchozích struktur. Je to řídká vazivová tkáň, ve které probíhají cévy a nervy. Zajišťuje výživu, inervaci a ochranu zubu proti infekci. Mikroskopické složení se mění v závislosti na věku, postupně houstne a celá dutina se zmenšuje v důsledku tvorby sekundárního dentinu. Zubní dřeň deciduální i sekundární dentice je také bohatým zdrojem kmenových buněk, které je dále možno použít v oblasti tkáňového inženýrství (Gronthos et al., 2000).

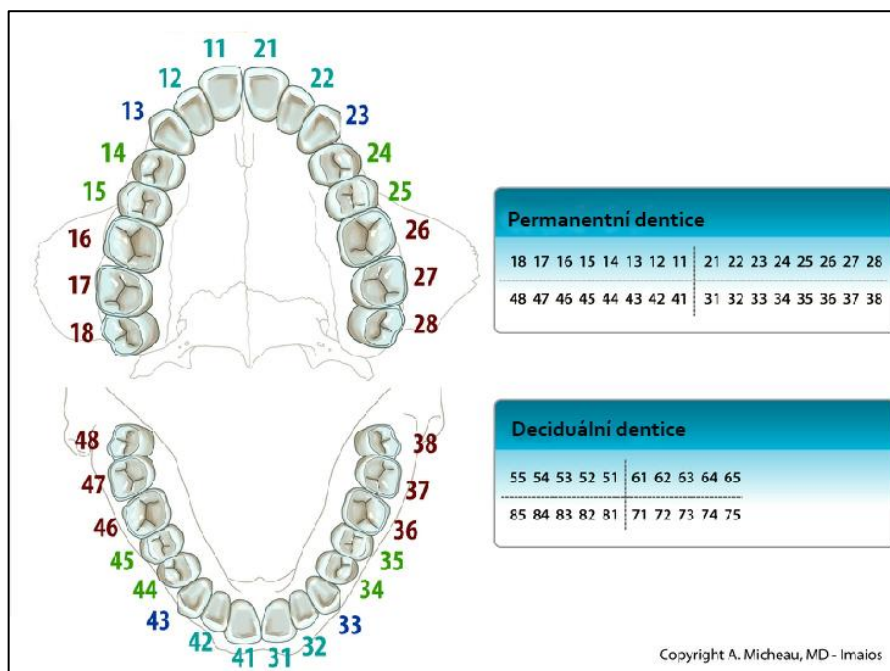
**Ozubice** (*periodont*) vyplňuje tenký prostor mezi cementem a alveolem na povrchu kořene. Jeho hlavní součástí jsou periodontální vazy, které se na jedné straně upevňují k cementu (Sharpeyova vlákna) a na druhé straně ke kosti alveolu a nebo dalším zubům.

### 3.2 Charakteristika dentice člověka

Lidský chrup vzniká ve dvou generacích. První jsou zuby deciduální (mléčné, dočasné), kterých je 20, postupně je nahrazuje a doplňuje 32 zubů permanentních (stálých). Dentice člověka je heterodontní, obsahuje tedy čtyři druhy zubů: řezáky (*dentes incisivi*), špičáky (*dentes canini*), zuby třenové (*dentes praemolares*) a stoličky (*dentes molares*). Dočasný chrup se skládá z 8 řezáků, 4 špičáků a 8 stoliček. Trvalý chrup má 8 řezáků, 4 špičáky, 8 třenových zubů a 12 stoliček.

Ve výzkumné i lékařské praxi se pro označení zubů používají kódy, které vyjadřují umístění zubu v dentici. K tomu slouží tzv. zubní vzorce, kterých bylo vypracováno několik druhů s použitím čísel nebo písmen (např. podle systému FDI, viz obr. 2).

Zuby jsou v čelistech uloženy ve dvou obloucích nestejného tvaru. Horní oblouk tvoří polovinu elipsy, dolní oblouk je menší a má tvar paraboly. Proto při správném skusu přesahují mírně horní zuby přes zuby dolní čelisti. Zuby, které se dotýkají při skusu (okluzi) se nazývají antagonisté.



Obr. 2. Zubní vzorec člověka dle systému FDI. Převzato z:

<http://www.imaios.com/en/e-Cases/Channels/Classifications/Tooth-number>

### 3.3 Prenatální vývoj dentice člověka

Vývoj obličeje je založen na růstu a spojování obličejových výběžků: **mediálního a laterálního nasálního, párových maxilárních a párových mandibulárních** (Moore a Persaud, 2002). Faciální výběžky jsou derivátem prvního páru faryngových oblouků. Tyto výběžky jsou tvořeny mezenchymem, na povrchu kryty ektodermem, který se začíná v 6. týdnu ztlušťovat a proliferovat do hloubky. Na mediálních nasálních, maxilárních a mandibulárních výběžcích tak vznikají okrsky odontogenního ztlustělého epitelu, které se po spojení obličejových výběžků rovněž propojují v souvislý základ dentice v horním i dolním čelistním oblouku (Nery et al, 1970).

Vývoj dentální lišty je úzce spojen s vývojem *vestibulum oris*. V některých místech mandibuly se základ *vestibulum oris* vyvíjí společně s dentální lištou (Hovorakova et al., 2007). Prokázána byla také obdobná molekulární regulace během vývoje obou struktur jak na myším modelu (Turecková et al., 1995), tak i na lidských embryích (Davideau et al., 1999). Ve vestibulárním epitelu se během vývoje přechodně vytváří struktury, které jsou morfologicky podobné zubním primordiím. Tyto rudimentární struktury mohou hrát roli při vzniku patologií v ústní dutině (Hovorakova et al., 2005, 2007).

Vývoj zubů představuje velmi dlouhé období, které začíná již v šestém prenatálním týdnu vznikem dentální lišty. Z dentální lišty vznikají základy zubů deciduální dentice, a pozdějším subepiteliálním růstem zadního konce zubní lišty také zárodky tří molárů permanentní dentice. Již v sedmém týdnu embryonálního vývoje jsou vyvinuta primordia první stoličky (m1), špičáku (c) a řezáků (i1,2), v dolní čelisti o něco dříve než v horní (Hovorakova et al., 2005; 2007). Postupně vznikají v obou čelistech zárodky druhých deciduálních molárů (m2), až vznikne v každé čelisti 10 primordií pro dočasný dětský chrup. Dentální lišta je však přechodný útvar. Během pozdních stádií vývoje zubních primordií se začíná rozpadat, takže zubní primordium dále ztrácí kontakt s povrchovým epitelem. Zbytky buněk dentální lišty mohou přetrvávat v gingivě jako epitelové (Serresovy) ostrůvky, které mohou tvořit cysty (Horký a Nováková, 2005).

Mineralizace dentinu a skloviny budoucí zubní korunky začíná v dočasné dentici ve 4. prenatálním měsíci.

### 3.4 Postnatální vývoje lidské dentice

V dětství probíhá výměna mléčných zubů za permanentní. V období mezi šestým a dvanáctým rokem se v čelisti vyskytují oba druhy dentice, hovoříme tedy o **smíšené dentici**. V dospělosti dochází k pozvolnému dorůstání zubů, prořezávání 3. stoliček, tzv. zubů moudrosti, k růstu sekundárního dentinu a ve stáří případně k abrazi skloviny. Vývoj zubu tedy prakticky končí až ztrátou zubu nebo smrtí jedince.

Kořeny se vyvíjí a rostou zejména až po prořezání zubů do 3. /4. roku. Jako první se prořezávají první a druhé řezáky, dále pak první stoličky a teprve po nich špičáky. Většinou platí, že: dříve se prořezávají zuby v dolní čelisti, prořezávání probíhá v párech (tj. současně se prořezává pravý a levý zub), a u děvčat zpravidla dříve než u chlapců. Je však potřeba si uvědomit, že existují výjimky a značné individuální rozdíly. Opožděné

prořezávání zubů však může také poukázat na systémovou nebo nutriční poruchu, jakou je např. nedostatečná funkce hypofýzy nebo štítné žlázy. Prořezání dočasného chrupu by mělo být dokončeno do 2 a  $\frac{3}{4}$  roku dítěte. Od pátého roku začíná činností osteoklastů resorpce kořenů mléčných zubů.

Jako první zub trvalé dentice se kolem 6. roku prořezává v dolní čelisti první molár (M1) či první řezák (I1). Kolem 7. - 8. roku dochází k vypadávání druhých deciduálních řezáků, následované prořezáním trvalých řezáků (I2). Poté dochází k výměně prvního dočasného moláru za permanentní první premolár (P1) či k výměně špičáků (C). Dočasné stoličky jsou tedy vývojově ve skutečnosti mléčné zuby třenové, které jsou nahrazovány permanentními premoláry. Mezi 10. a 14. rokem probíhá prořezávání ostatních zubů, a to druhých premolárů a druhých molárů. Prořezávání 3. molárů je vysoce individuální, mezi 17. až 30. rokem. U 20 % procent lidské populace se třetí molár dokonce vůbec nevytváří (Lavelle et al., 1970; Vastardis, 2000) nebo se neprořezává. V některých případech se musí chirurgicky odstraňovat, což může přinést komplikace jako je poranění *nervus alveolaris inferior* a následné ochrnutí části tváře (např. Renton et al., 2005). Široká variabilita v pořadí prořezávání permanentních zubů je popsána např. v publikaci Kochhara a Richardsona (1998).

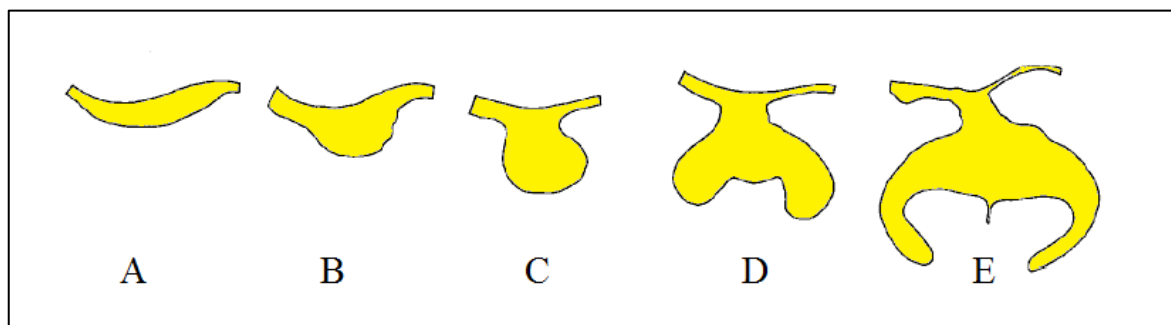
### 3.5 Obecný vývoj zubu a molekulární regulace

Vývoj savčího zubu je složitý proces, který je založen na vzájemné interakci **orálního epitelu** pocházejícího z ektodermu a mezenchymu původem z buněk neurální lišty (**ektomezenchymu**). Sklovina je produktem specializovaných epitelových buněk (ameloblasty). Všechny ostatní tkáně diferencují z okolního mezenchymu. Nejčastějším modelem pro výzkum vývoje zubů je z etických i praktických důvodů myší dentice (většinou první molár M1 či řezáky). Experimenty na myších jsou výhodné z hlediska jejich krátké generační doby (10 týdnů), snadného přístupu k embryonálnímu materiálu a možnosti tvorby transgenních linií i knockoutů. Vývoj myší dentice je intenzivně studován také jako obecný model interakcí mezi epitelem a mezenchymem během organogeneze (např. Thesleff et al., 1995; Dassule a McMahon, 1998).

Odontogeneze je plynulým procesem, obvykle ji však rozdělujeme na stadia odrážející tvar zubního epitelu na frontálních histologických řezech: **ztluštění orálního epitelu, dentální lištu, zubní pupen, zubní pohárek a zvonek** (viz obr. 3.). Hlavní roli v tomto



složitým procesu zaujímá jak proliferace, apoptóza a migrace buněk, tak poziční informace regulovaná morfogenetickými gradienty, stejně jako mezibuněčné interakce a vzájemné působení buněk s extracelulární matrix.



**Obr. 3. Schéma typického tvaru dentálního epitelu v jednotlivých stádiích vývoje zubu, A – stadium orálního ztlustění, B – stadium dentální lišty, C – stadium zubního pupene, D – stadium pohárku, E – stadium zvonku (upraveno podle Peterková et al. 2002).**

Histologické řezy a trojrozměrné (3D) rekonstrukce jednotlivých stadií umožňují sledovat morfologické změny ve vývoji primordia zubů (např. na myších Peterková et al., 1993b; 1996; Lesot et al., 1996, na lidských embryích např. Bolk, 1921; Ooe, 1956; Radlanski, 1995, Hovorakova et al., 2005; 2007). Obdobně jsou studovány změny v proliferaci různých částí primordia na rutinních histologických řezech (např. Lesot et al., 1996) nebo pomocí inkorporace BrdU (např. Jernvall et al., 1994; Coin et al., 1999). Osud určitých oblastí primordia zubu může být zkoumán také pomocí kultur *in vitro* a časosběrné mikroskopie s využitím fluorescenčních markerů (např. Diekwisch, 2002; Prochazka et al., 2010). Podstatnou částí výzkumu je také studium molekulární regulace, např. pomocí *in situ* hybridizace, a to jak v místech, kde primordia zubů přetrvávají a dále rostou, tak v místech, kde zanikají (např. Zhao et al., 2000; Coin et al., 2000; Prochazka et al., 2010; Hovorakova et al., 2011, Porntaveetus et al., 2011). Odlišné molekulární mechanismy ovlivňují vývoj molárů a vývoj řezáků (např. Hovorakova et al., 2013), nebo vývoj zubů horní a dolní čelisti (např. Wang et al., 2005; Klein et al., 2006).

Vědci za posledních 20 let identifikovali ve studiích na zvířecích modelech a lidech mnoho různých signálních molekul, které působí v určitých fázích vývoje zubů a regulují jejich diferenciaci, správný tvar a velikost. Hlavní signální dráhy řídí proteiny z genových rodin **FGF**, **Hedgehog**, **Wnt**, **TGFβ** (zahrnující také podrodinu **BMP**), **EGF** a **TNF** (pro přehled např. Thesleff, 2003). Stejně tak regulují vývoj také inhibitory zmíněných

signálních drah, např. *Foliatin* (BMP), *Ectodin* (Wnt, BMP), *Sprouty* (FGF) či *Gas1* (Wang et al., 2004; Kassai et al., 2005; Klein et al., 2006; Seppala et al., 2007) a transkripční faktory jako např. *Msx1*, *Runx2*, *Pax9*, *Gli1*, *Lef1* atd. (viz <http://bite-it.helsinki.fi/>). Experimenty prováděné na transgenních myších ukázaly, že inaktivované geny ze jmenovaných genových rodin vedou zpravidla k různým poruchám ve vývoji zubu, jako je zubní ageneze nebo zastavení růstu v raných fázích vývoje (např. Peters a Balling, 1999; Thyagarajan et al., 2003). Např. inaktivace *Fgf8* v dentálním epitelu vede k zastavení ve fázi dentální lišty (Trumpp et al., 1999). Oproti tomu stimulace Wnt signální dráhy v orálním ektodermu transgenních myší vede ke vzniku zubů *de novo* (Wang et al., 2009). Signální molekuly většinou regulují interakce mezi ektodermem a mezenchymem, nicméně existují i takové, které působí pouze v rámci dentálního epitelu, jako např. *Ectodysplasin* a jeho receptor *Edar* (Kere et al., 1996; Thesleff, 1996).

### 3.5.1 Iniciační fáze

Před prvními projevy morfologického vývoje zubu je v odontogenním mezenchymu, tedy v místech budoucích zárodků zubů, exprimován transkripční faktor *Pax9*, který je aktivován genem *Fgf8* z dentálního epitelu, zatímco v ostatním mezenchymu je inhibován molekulami *Bmp4* a *Bmp2* (Neubüser et al., 1997). Iniciační fáze vývoje jsou typické zejména proliferací aktivitou dentálního epitelu.

Za první projev morfologického vývoje zubu se považuje **ztluštění orálního epitelu**, které se u myší objevuje kolem 11,5 dne embryonálního vývoje. V dentálním epitelu se exprimují geny *Fgf8* (Kettunen a Thesleff, 1998), *Fgf17* (Porntaveetus et al., 2011), *Sonic Hedgehog* (dále *Shh*) (Bitgood a McMahon, 1995), *Wnt10a*, *Wnt10b* (Sarkar a Sharpe, 1999; Dassule a McMahon, 1998); *Edar* (Tucker et al., 2000), *Isl1* (Mitsiadis et al., 2003) a transkripční faktory jako *Pitx2*, *Dlx2* či *Lef1* (Semina et al., 1996; Zhao et al., 2000; van Genderen et al., 1994). *Shh* zvyšuje buněčnou proliferaci v určitých místech, zajišťuje proliferaci buněk dentálního epitelu a jeho zanořování do mezenchymu (Iseki et al., 1996; Hardcastle et al., 1998; Dassule et al., 2000). V ektomezenchymu se exprimují např. *Bmp4* (Aberg et al., 1997), *Wnt5a*, *MFrzb1*, *MFrpb2* (Sarkar a Sharpe, 1999) či *Msx1* (Yamashiro et al., 2003).

Ve stadiu **dentální lišty**, kolem embryonálního dne 12,5 (dále ED), buňky dentálního epitelu dále proliferují a invaginují do mezenchymu. Již v těchto iniciačních fázích se

v epitelu i mezenchymu exprimují geny všech hlavních signálních rodin (BMP, FGF, *Shh* a Wnt). V tomto stadiu dochází k formování tzv. časného signálního centra. Toto přechodné časné signální centrum exprimuje geny ze všech hlavních genových rodin, a stejně tak další geny spojené se signalizací, jako je *p21*, *Msx2* a *Lef1* (např. Jernvall a Thesleff, 2000). Tento signál však koresponduje se signálem rudimentálního primordia MS (Prochazka et al. 2010), více viz níže.

### 3.5.2 Stadium zubního pupenu

**Stadium zubního pupenu** je typické aktivitou **mezenchymu**, který začíná okolo vznikajícího pupenu kondenzovat kolem ED 13,5. Interakce mezi dentálním epitelem a mezenchymem jsou intenzivně studovány pomocí analýz exprese různých genů. Nejpodstatnější část tvoří experimenty na myších, kde je u knockout<sup>1</sup> myši zastaven vývoj zubu v určitém stádiu. Pomocí této analýzy je pak možné blíže určit funkci, čas a místo působení jednotlivých genů, morfogenů, transkripčních faktorů a jejich vztahy. Právě stadium zubního pupenu je nejčastější fáze, kdy dochází k zástavě vývoje u mnoha druhů knockout myši (Peters a Balling, 1999; Jernvall a Thesleff, 2000).

### 3.5.3 Stadium zubního pohárku, sklovinný uzel a jeho význam

Vývoj zubního **pohárku** u myši během ED 14,5 začíná proliferací epitelu v oblasti budoucí cervikální smyčky. Ve stadiu pohárku je ještě vyšší proliferační aktivita mezenchymu, který stále více kondenzuje okolo zubního pupenu a indukuje vytváření struktury známé jako **primární sklovinný uzel (pEK)** – primary enamel knot, viz obr. 4.).

Sklovinný uzel je viditelný i na histologických preparátech jako koncentrace epitelových buněk uprostřed vnitřního sklovinného epitelu. Byl poprvé popsán již před sto lety (Ahrens, 1913). Tento shluk nedělících se epiteliálních buněk exprimuje několik důležitých genů jako je např. *Shh*, *Fgf-3,-4,-9*, *Bmp-2,-4,-7*, *Wnt10b*, *Edar* a dále také *Lef1*, *Msx2*, *p21* (Jernvall et al., 1994; Vaahtokari et al., 1996; Sarkar a Sharpe, 1999; Tucker et al., 2000; Nadiri et al., 2004). Sklovinný uzel byl proto klasifikován jako důležité signální centrum, které stimuluje proliferaci orgánu skloviny a řídí vývoj tvaru hrbolků zubu (Jernvall et al., 1994; Vaahtokari et al., 1996; Thesleff a Jernvall, 1997).

---

<sup>1</sup> záměrná inaktivace určitého genu v rámci genomu myši

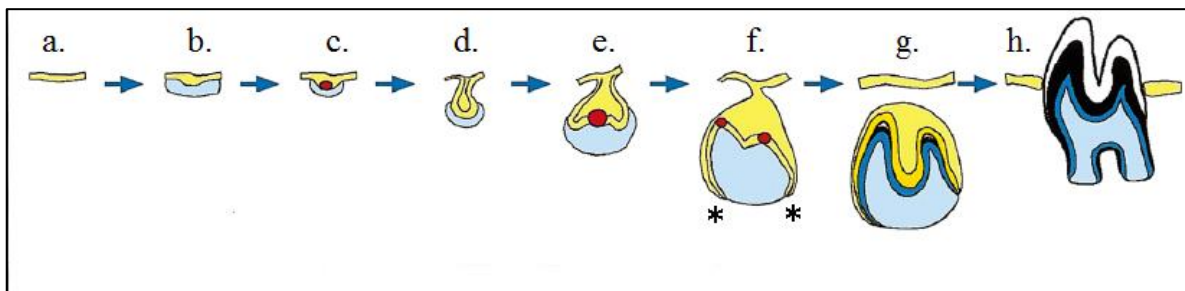
Formování sklovinného uzlu regulují signální molekuly rodin Wnt a BMP, zejména pak **Bmp4**. Protein **Bmp4** indukuje tvorbu *p21*, což je inhibitor cyklin-dependetních kináz, tedy inhibitor buněčného cyklu. *P21* je tak jedním z markerů neproliferujících buněk primárního sklovinného uzlu (Jernvall et al., 1998). Sklovinný uzel je však přechodná struktura, která zaniká na konci stadia pohárku, což je spojeno s výraznou apoptózou (Lesot et al., 1996; Peterková et al., 2003). Pravděpodobně ale apoptóza není primárním faktorem, proč sklovinný uzel zaniká. Coin et al. (2000) použili v kultuře moláru *in vitro* inhibitor kaspáz (Z-vad-fmk), který inhibuje indukci apoptózy. Přesto se primordium zubu dále normálně vyvíjelo.

Zvláštní význam v této fázi mají také transkripční faktory *Msx1* a *Pax9*. Inhibice *Msx1* a *Pax9* vede ke snížení odpovědi **Bmp4** a zástavě vývoje ve stadiu pupene (Satokata a Maas, 1994; Chen et al., 1996; Peters et al., 1998). Také u člověka vede mutace těchto transkripčních faktorů k zástavě vývoje a hypodoncii (Stockton et al., 2000; De Mynck et al., 2004).

Vysoká proliferace buněk mimo sklovinný orgán a nízká proliferace sklovinného orgánu vede k prodlužování okrajů zubního pohárku a formování jeho typického tvaru. Během stadia pohárku se zřetelně diferencuje zubní epitel ve dvě vrstvy, **vnitřní a vnější zubní epitel** (IDE a ODE), mezi nimiž vzniká řídké **hvězdčité retikulum** (viz obr. 5.). Místo přechodu IDE a ODE, ležící na prodlužujícím se okraji zubního pohárku (na apikálním konci zubního primordia), se nazývá **cervikální smyčka**. Tato část epitelu se vyznačuje zřetelně vyšší mitotickou aktivitou. U řezáků hlodavců zajišťuje jejich dorůstání po celou dobu života, neboť se zde nachází niche kmenových buněk (Harada et al., 2002). Mezenchymální buňky v prohlubni pohárku vytvářejí **dentální papilu**, buňky obklopující epitelový pohárek vytvářejí později **zubní vak** (více např. Rothová et al., 2012). Ze zubního vaku vzniká cement a systém periodontálních ligament. Dentální papila je v budoucnu zdrojem pro vytvoření buněk zubní dřeně a odontoblastů.

Primordia myších řezáků mají pouze jedno signální centrum (pEK), ovšem u primordií molárů se později vytváří ještě **sekundární sklovinné uzly (sEK)** (Jernvall et al., 1994; Thesleff et al., 2001; Matalova et al., 2005). Experimenty kultur *in vitro* pomocí značení BrdU na prvním moláru (M1) ukázaly, že buňky primárního sklovinného uzlu, které přiléhají k bazální membráně, nepodléhají apoptóze, ale oddělí se do několika skupin buněk, každá odpovídající jednomu vyvíjejícímu se hrbolku zubu (Coin et al., 1999). Jiné experimenty však tuto hypotézu vyvracejí, a pomocí DiI značení, popisují u pEK zánik

apoptózou a buňky sekundárních sklovinných uzlů považují za buňky odlišného původu (Matalova et al., 2005). Další studie pomocí podobných experimentů popisuje společný původ pEK a jednoho ze sekundárních sklovinných uzlů (Cho et al., 2007). Lze tedy říci, že osud buněk prvního sklovinného uzlu ani původ buněk sekundárních signálních center nebyl doposud úplně objasněn.



**Obr. 4. Schématická vyvojová stadia zubu.** a.,b.,c. – iniciační fáze (červeně vyznačeno časné signální centrum), d. – stadium pupene, e. – stadium pohárku (červeně pEK), f. – stadium zvonku (červeně sEK, hvězdičkami označeny cervikální smyčky), g. – stadium pozdního zvonku a počátek mineralizace, h. – erupce zubu, žlutě epitel, modře mezenchym (upraveno podle Jernvall a Thesleff, 2000).

#### 3.5.4 Stadium zubního zvonku, sekundární sklovinné uzly

Ve **stadiu zubního zvonku** (ED16,5) se v primordiu moláru na vrcholu každého budoucího hrbolku vytváří **sekundární sklovinné uzly** (**sEK** = secondary enamel knot) (Jernvall et al., 1994; Thesleff et al., 2001; Matalova et al., 2005, viz obr. 4.). To opět vede k prohýbání vnitřního sklovinného epitelu a formování komplexní struktury zubní korunky.

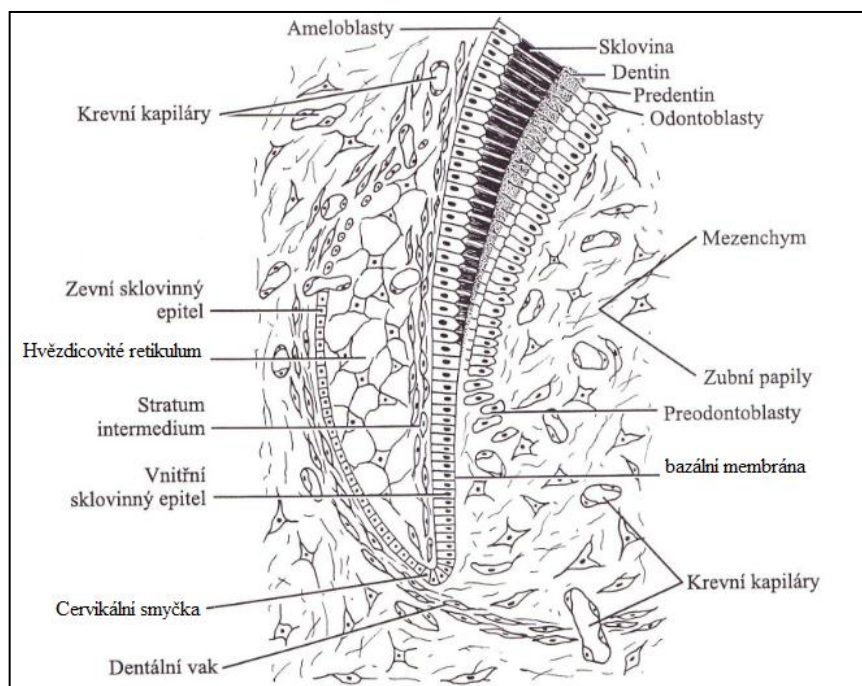
Stejně jako primární uzel jsou sekundární sklovinné uzly přechodné epiteliální struktury, které jsou charakteristické absencí buněčného dělení a expresí genů, ze stejných genových rodin (Thesleff, 2003). Úplná absence dělicích se buněk byla však prokázána pouze v sekundárním sklovinném uzlu, který vzniká jako první (Obara a Lesot, 2007).

V pozdním stadiu zubního zvonku se iniciuje také růst kořene. Dentální epitel progresivně vrůstá dále do mezenchymu v místech cervikální smyčky a vytváří tzv. Hertwigovu epiteliální kořenovou pochvu (HERS), která dále vrůstá do mezenchymu, iniciuje a řídí růst kořene. Kořen zubu dále roste a vyvíjí se během prořezávání zubu. Je tvořen dentinem, na jehož povrchu je místo skloviny zubní cement (původem z dentálního vaku) (Yoshikawa a Kollar, 1981).

### 3.5.5 Mineralizace zubních tkání

Po vymizení sekundárních sklovinných uzlů diferencují mezenchymové buňky dentální papily, přilehlé k vnitřní vrstvě zubního epitelu, v **odontoblasty** a začínají produkovat predentin. Kromě odontogeneze zajišťují také mineralizaci dentinu, neboť mají hlavní roli v transportu vápníku (Linde, 1995). Mezi odontoblasty a ameloblasty probíhají recipročně indukční interakce. Zrající ameloblasty indukují terminální maturaci odontoblastů. Zralé odontoblasty začínají produkovat predentin, který je zase spouštěcím signálem pro sekreci skloviny ameloblasty (viz obr. 5).

Těla odontoblastů jsou s přibývajícím dentinem zatlačována hlouběji do centra zubu a zanechávají za sebou pouze dlouhé výběžky své apikální části – **Tomesova vlákna**. Ty mají význam pro udržování vitality již hotového dentinu. Vrstva odontoblastů zůstává zachována a je schopna během celého života zubu produkovat predentin, který se postupně mění v dentin. Po diferenciaci odontoblastů se zubní papila mění v zubní pulpu.



**Obr. 5. Schéma znázorňující počátek dentinogeneze a amelogeneze v oblasti korunky (upraveno podle Horký a Nováková, 2005).**

Buňky vnitřního sklovinného epitelu se diferencují v **ameloblasty**, které začínají produkovat sklovinu na povrch dentinu (dovnitř primordia zubu). Sklovina i dentin se nejdříve vytvářejí na vrcholu zubních hrbolků molárů (nebo na vrcholu řezáku) a poté se šíří směrem ke krčku zubu. Na rozdíl od produkce dentinu je sekrece skloviny ameloblasty

omezena a poté, co sklovina dosáhne patřičné tloušťky, přestávají ameloblasty secernovat a mění se v buňky, které tvoří nezvápenatělou vrstvu, tzv. dentální kutikulu (Nasmythova membrána), na povrchu skloviny. Dentální kutikula pokrývá v gingivě sklovinu zubů před tím, než se zuby prořezají. Po prořezávání zubů dentální kutikula splývá s gingiválním epitelem a částečně přetrvává v oblasti krčku zubů.

Proximálně od vrstvy ameloblastů vzniká ještě jedna vrstva buněk – **stratum intermedium** (SI), o níž zatím není mnoho známo. Mezi její hlavní funkce zřejmě patří regulace transportu látek potřebných pro sekreci skloviny, stabilizace vnitřního sklovinného epitelu (Wakita a Hinrichsen, 1980; Nakamura a Ozawa, 1990) či zdroj energie (Chardin et al., 1989).

### 3.6 Rudimentární struktury a atavismy

Studium vývoje dentice nám mohou usnadnit také útvary, jako jsou rudimenty, vestigia a atavizmy (Hall, 2003). Jsou to struktury, které můžeme definovat jako pozůstatky vývojově starších předchůdců. Atavizmy a rudimenty zajímaly evoluční biology již od antiky a staly se jedním z hlavních důkazů Darwinovy evoluční teorie.

Atavismus je znak, biologickou či kulturní evolucí již vymizelý, který někdy zřídka nalezneme u několika dospělých jedinců v populaci. Oproti tomu rudimenty jsou neplnohodnotná primordia struktur zaniklých během evoluce, která se přechodně objevují během vývoje u všech jedinců v populaci. Ačkoliv se rudimenty mohou po krátkou dobu vyvíjet pouze prenatalně, jako vestigiální struktury mohou přetrvávat také do dospělosti. U lidí najdeme mnoho různých vestigiálních struktur, jako jsou appendix, kostrč (pozůstatek zakrnělého ocasu) nebo ušní svaly. Dalším příkladem z třídy savců jsou velryby, u kterých se během prenatalního vývoje objevuje rudimentární základ zadní končetiny. Začíná se vyvíjet normálním způsobem, ale později degeneruje. Výjimečně se může vyvinout zakrnělá končetina a přetrvat až do dospělosti, jedná se tedy potom o atavismus. Také rudimentární primordia zubů jsou považována za projev tzv. fylogenetické paměti (Peterková et al., 2006). Například dvě velká rudimentární primordia v diastemě horní i dolní čelisti (více níže) pravděpodobně odpovídají premolárům, které byly eliminovány během evoluce hlodavců (Peterková et al., 1996, 2002).



Rudimentární zárodky zubů se prenatalně vyskytují u mnoha druhů, jako jsou např. vačnatci, tuleni, ovce (Moss-Saletijn 1978), hraboši (Witter et al., 2005) a neposledně myši (např. Hinrichsen, 1959; Fitzgerald, 1973; Peterková et al., 1993a; 1996).

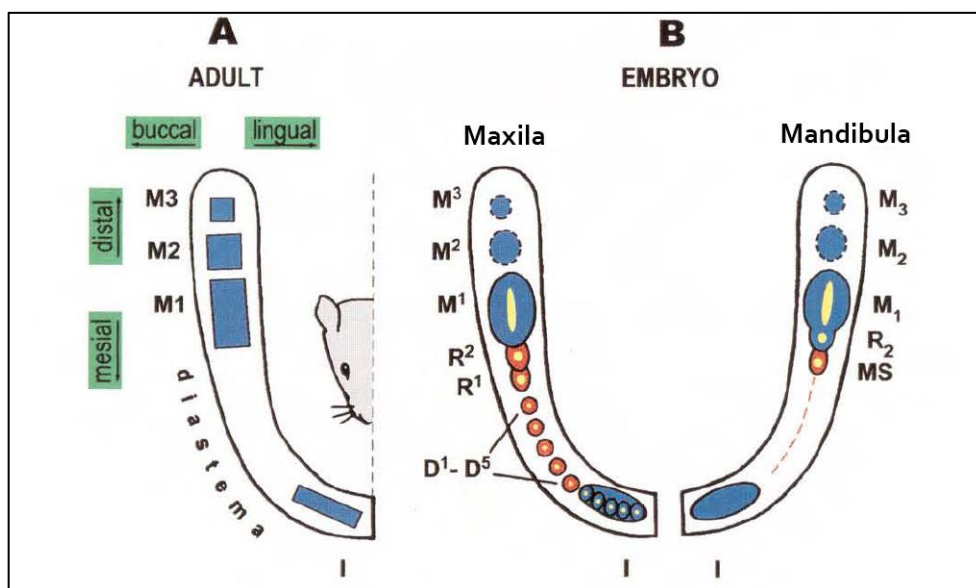
U myši, krysa a králíků se v blízkosti sklovinného orgánu normálního řezáku vyvíjí malý rudimentární zub, nazývaný deciduální řezák (Freund, 1892; Woodward, 1894; Moss-Saletijn, 1978; Peters a Strassburg, 1969). Kromě primordií v blízkosti řezáků se u myši vyvíjí také další rudimentární primordia v oblasti budoucí diastemy (např. Peterková et al., 1993a, 1995, 1996; 2000; Lesot et al., 1998; Viriot et al., 2000).

Jak už bylo popsáno výše, adultní dentice myši se skládá z jednoho řezáku a tří molárů, které jsou odděleny bezzubou diastemou v každém kvadrantu čelisti. Myší embryo se tedy od tohoto schématu liší krátkým vývojem několika rudimentárních zubních primordií. V přední části horní čelisti byla nalezena zubní lišta a postupně rozpoznáno 5 malých rudimentárních primordií, **D1-D5** (Peterková, 1983, 1993a, 1995; Lesot et al. 1998), která později zcela zanikají (Turečková et al., 1996). V zadní části diastemy horní čelisti se vyvíjejí velká primordia **R1** a **R2** (Peterková et al., 1996). V přední části diastemy dolní čelisti nejsou patrná malá „D“ zubní primordia jako v čelisti horní. Místo nich se kolem ED 12,5 krátce vytváří pouze tenká lišta (Peterková et al., 2000). V zadní části diastemy dolní čelisti se rovněž vyvíjejí velké zárodky **MS** a **R2** (Viriot et al., 2000; Peterková et al., 2000), (viz obr. 6.). Primordium řezáku v horní čelisti vzniká spojením pěti až šesti malých rudimentárních primordií, která připomínají zubní plakody u plazů (Peterková et al., 1993b, 1995). Obdobně v místě budoucího řezáku v dolní čelisti jsou nejprve patrná tři zubní primordia (Peterková et al., 2002). Malé zubní zárodky v horní čelisti (D1-D5) jsou zřejmě pozůstatky zubů fylogeneticky starších předků, zatímco ostatní velká primordia jsou dokladem premolárů zmizelých až během evoluce myši (Peterková et al., 2000; Viriot et al., 2002). Malá zubní primordia v oblasti řezáku u myši byla považována za tzv. „mléčný“ řezák (Woodward, 1894; Fitzgerald, 1973).

Primordium MS (mesial segment) se nejvýrazněji vyvíjí během 12,5 embryonálního dne (ED 12,5), R2 o den později (13,5 ED) (Viriot et al., 2000). V embryonálním dni 14,5 dochází k vlastnímu vývoji pohárku budoucí M1 spolu se vznikem jeho primárního sklovinného uzlu. Velká rudimentární zubní primordia mají rozdílný osud. Primordium R2 dolní čelisti je později začleněno do prvního moláru (Viriot et al., 2000; Prochazka et al., 2010). R1 a R2 horní čelisti, stejně jako MS dolní čelisti zastavují růst na stádiu pupenu za přítomnosti apoptózy a dávají vznik epitelovým valům, které vzadu splývají s primordiem



M1 (Obr. 6) (Peterková et al, 1996; Viriot et al, 2000) a mohou být začleněny do M1 během pozdějšího vývoje (Lesot et al, 1996; Peterková et al, 2000), (viz. Obr. 7). Autoři také nevylučují další možné funkce těchto rudimentárních primordií. Například primordium R2 i MS hrají roli při formování nadpočetného zubu u *Spry* mutantních myší (Peterková et al., 2009; Lagronová-Churavá et al., 2013). Rudimenty mohou hrát důležitou úlohu při poziční determinaci primordií funkčních molárů (Prochazka et al., 2010) i řezáků (Hovořáková et al, 2011, 2013).



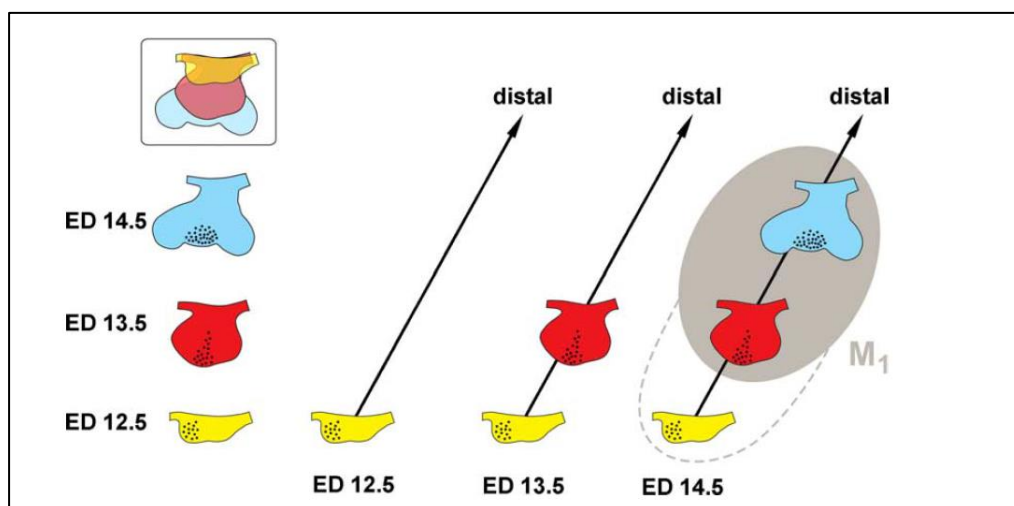
**Obr. 6. Porovnání dentice u dospělé myši a embrya.** A: Zubní vzorec funkční dentice myši se skládá z jednoho řezáku (I), bezzubé diastemy a tří molárů (M1, M2 a M3). B: Zubní vzorec během embryogeneze. V maxile se vyvíjí pět malých rudimentů (D<sup>1</sup>-D<sup>5</sup>) a dvě velká rudimentální primordia R<sup>1</sup> a R<sup>2</sup>. V mandibule se vyvíjí pouze dva velké rudimenty MS a R<sub>2</sub>. Modrou barvou jsou označeny progresivní zubní primordia, červeně regresivní zubní primordia a žlutě zubní plakody (převzato z Peterková et al., 2000).

Existence rudimentárních primordií MS a R2 byla popsána poměrně nedávno. Na základě histologických řezů se předpokládalo, že primordium M1 vzniká již kolem ED 12,5/13,5 (Vaahokari et al., 1996; Jernvall a Thesleff, 2000). Ovšem v dalších morfologických studiích bylo popsáno, že na těchto raných stádiích jde o primordia MS a R2, a samotný pEK prvního moláru vzniká až na ED 14,5 (Peterková et al., 2000; Viriot et al., 2000). Postupný vývoj rudimentárních primordií MS, R2 a následně M1 byl později ověřen také experimentálně (Prochazka et al., 2010). Bylo potvrzeno, že rudimentární primordia mají svá vlastní signální centra, která exprimují stejné geny jako pEK primordia

M1, např. *Shh* (Peterková et al., 2009; Prochazka et al., 2010). Exprese genu *Shh* jako markeru signální domény byla u zubních primordií MS, R2 a M1 popsána na ED 12,7; 13,3 a 14,3 (Prochazka et al., 2010). V oblasti řezáků bylo rovněž prokázáno, že exprese *Shh* od ED11,5 odpovídá rudimentárnímu řezáku a teprve na ED13,5 se objevuje posteriorně a hlouběji lokalizovaná expresní doména funkčního řezáku a to jak v dolní (Hovorakova et al., 2011), tak i v horní čelisti (Hovorakova et al., 2013).

Splynutí primordia R2 s prvním molárem pravděpodobně vysvětluje zvětšení M1 v průběhu evoluce myší. Stejně tak je popisováno zmenšení M1 u některých myší s vyvinutým nadpočetným zubem, což lze vysvětlit tím, že zde primordium R2 dá vznik nadpočetnému zubu a nemůže se tedy sloučit s M1 (Peterková 2005).

Nadpočetný zub před prvním molárem vzniká u některých myších mutantů, např. u kmenů: s overexpresí genu *Eda* či *Edar* – Kangas et al. (2004); Tucker et al. (2004), *Tabby* s mutací genu *Eda* – Grüneberg (1966); Peterková (2005), s mutantní alelou *Tg737<sup>orp</sup>* – Zhang et al. (2003), *Sprouty2,4* – Klein et al. (2006), *Gas1* – Ohazama et al. (2008), či *Osr2* – Zhang et al. (2009). Vytváření nadpočetných zubů u mutantních myší je vysvětlováno revitalizací rudimentálního základu premolárové dentice v diastemě (Peterková, 1983, Peterková et al, 2002, 2005) v souvislosti s ovlivněním signální aktivity v rudimentárních signálních centrech (Klein et al., 2006; Peterková et al., 2009; Lagronová-Churavá et al, 2013).



**Obr. 7. Vývoj rudimentálních zubních primordií.** Schéma znázorňující postupný vývoj rudimentálních primordií MS (žlutě), R2 (červeně) a M1(modře) a jejich typický tvar dentálního epitelu. R2 se později inkorporuje do pohárku M1 (šedivá oblast). MS podléhá regresi a možná se později začleňuje do M1 (přerušovaná čára). Černé tečky značí koncentraci apoptózy (převzato z Peterková et al., 2005).

Vznik funkčních zubů z těchto rudimentárních primordií u mutantních myší také poukazuje na to, že rudimentární struktury, které se během vývoje dentice mimo jiné objevují také u člověka (Hovorakova et al., 2005, 2007), mohou sloužit jako model pro řízenou zubní regeneraci (Peterková et al., 2006, 2009).

Dle dostupných dat obě rudimentární primordia, jak R2 tak MS, pravděpodobně hrají poměrně významnou roli v odontogenezi a ovlivňují vývoj dalších zubů (Prochazka et al., 2010), podobně jako se navzájem ovlivňují primordia molárů M1, M2 a M3 (Kavanagh et al., 2007). To podporuje také skutečnost, že tato primordia postupně úplně nezanikla a jsou u těchto savců udržována více než 50 miliónů let (Douzery et al., 2003).

### 3.7 Vývojové anomálie zubů

Lidské vrozené anomálie dentice mohou být způsobeny mutací některého genu regulující vývoj zubů. Studium těchto mutací nám pomáhá odhalit role jednotlivých signálních molekul a může být cestou k lepší diagnóze, ošetření či dokonce k vyvinutí léčebných postupů vývojových zubních anomálií. K těmto účelům bylo dosud vyvinuto již mnoho transgenních zvířat, aby bylo možné tyto poruchy zkoumat také experimentálně. Anomálie dentice se mohou týkat změn v počtu, tvaru, velikosti, polohy zubů či odchylek v mikroskopické stavbě tvrdých tkání (souhrnný článek viz Fleischmannova et al., 2008).

Změna počtu zubů se vyskytuje u značné části lidské populace, a to většinou ageneze (úplné chybění) třetích molárů (u 20 %), méně často pak druhých řezáků či premolárů (u 1,6 – 9,6 % populace) (Lavelle et al., 1970; Vastardis, 2000). Chybění zubu může být spojeno s některým syndromem postihující i další části těla či izolovaně. **Hypodontie** (chybění jednoho, až šesti zubů) může být spojena s mutacemi významných transkripčních faktorů *Msx1* a *Pax9* (Stockton et al., 2000; De Muynck et al., 2004). Oba tyto důležité transkripční faktory jsou exprimovány dentálním mezenchymem již v rané fázi vývoje zubu (viz výše) a regulovány působením genů *Fgf* a *Bmp* (Satokata a Maas, 1994; Chen et al., 1996; Peters et al., 1998).

Výskyt nadpočetných zubů se vyskytuje u 1-3 % lidské populace (Fleischmannova et al., 2008), například u autozomálně dominantního onemocnění kleidokranialní dysplazie, které je způsobeno mutací transkripčního faktoru *Runx2* (Mundlos et al., 1997). Pacienti trpí řadou skeletálních vad, jako jsou trvale otevřené fontanely, hypoplastické klíční kosti, malformace obličeje, obratlů, a také právě výskytem mnoha nadpočetných zubů, jejich

neprořezávání či zpoždění ve vývoji. Díky experimentům na transgenních myších se ukázalo, že právě *Runx2* u myši inhibuje růst sekundární dentice (Wang et al., 2005).

Tvar i počet zubů v raném embryonálním vývoji ovlivňují např. molekuly ektodysplazinové (*Eda*) signální dráhy. Mutace v této signální dráze vedou k syndromu označovanému jako hypohidrotická ektodermální dysplazie (Kere et al., 1996). U této vrozené choroby se abnormálně vyvíjejí vlasy, kůže, potní žlázy a právě také zuby, které mají defektní tvar nebo chybějí.

Anomálie v mikroskopické stavbě tvrdých tkání můžeme rozdělit podle složení zubu na dvě skupiny, jedny poruchy postihují dentin a druhé sklovinu. Mezi vrozené vady dentinu patří ***dentinogenesis imperfecta*** a **dysplazie dentinu**, obojí způsobené mutací v genu *Dspp* (Thyagarajan et al., 2001). Zuby mají hnědou až šedomodrou barvu, defektní tvar, užší kořeny a dochází u nich snadno ke ztrátě skloviny a obnažení dentinu.

***Amelogenesis imperfecta*** označuje skupinu vrozených vad skloviny. Vyznačují se abnormální strukturou či tenčí vrstvou skloviny, jako je tomu u hypoplastického typu AI. U typu hypokalcifikované AI je sklovina méně pevná, má žlutou barvu a dochází k rychlé abrazi korunek zubů. *Amelogenesis imperfecta* způsobují mutace v genech pro proteiny extracelulární matrix skloviny, mezi které patří **amelogenin** (*Amelx*), **enamelin** (*Enam*), **ameloblastin** (*Ambl*) a proteinázy **enamelysin** či **kalikrein 4** (*Klk4*) (Lagerström et al., 1991; Rajpar et al., 2001; Krebsbach et al., 1996; Caterina et al., 2002; Hart et al., 2004).

Právě těmito extracelulárními proteiny, které jsou syntetizovány ameloblasty, je regulována tvorba skloviny. Tyto proteiny regulují růst krystalů hydroxyapatitu, jeho strukturu a orientaci molekul navzájem. Všechny jejich funkce však dosud nebyly zcela objasněny. Většinu (90 %) proteinů skloviny tvoří amelogeniny. Amelogeniny hrají hlavní roli během mineralizace skloviny a při jejích dalších morfologických změnách (Termine et al., 1980). Geny pro amelogeniny jsou exprimovány z chromozómu X (*Amelx* – 90 %) a kódující části chromozómu Y (*Amely* – pouze 10 %) (Nakahori et al., 1991; Salido et al., 1992). Kopie genů na chromozómech X a Y nepodléhají homologní rekombinaci, a tak se také staly genetickým markerem k rychlé identifikaci pohlaví pomocí PCR (Sullivan et al., 1993).

Amelogeniny byly dlouho považovány pouze za proteiny skloviny. Ovšem některé isoformy amelogeninů se také našly v matrix dentinu (Nebgen et al., 1999), buňkách periodontálních ligament a Hertwigovy kořenové pochvy (Fong a Hammarström, 2000). Nedávno byl jejich výskyt popsán dokonce i mimo zubní tkáň v buňkách dlouhých kostí,

chrupavek (Haze et al., 2007) očí i mozku (Gruenbaum-Cohen et al., 2009). Výskyt amelogeninů v těchto rozdílných tkáních tak zřejmě reflektuje různé funkce těchto proteinů.

Velmi podstatným objevem v oblasti léčby poruch dentice se stal **Emdogain** (Heijl et al., 1997). Emdogain, odvozen právě od proteinů matrix skloviny (EMD = enamel matrix derivative), tedy složen hlavně z jedné isoformy amelogeninu, se stal látkou úspěšnou v obnově periodontálních ligament (Sculean et al., 2000; Warotayanont et al., 2009). Studium amelogeninu jako genu i ostatních proteinů matrix skloviny má tak jistě velký potenciál v oboru buněčné terapie i tkáňového inženýrství.

### **3.8 Kmenové buňky v oblasti zubů a jejich význam pro člověka**

I když ztráta zubu neohrožuje život jedince, jistě může způsobit různé problémy se zpracováním potravy, artikulací, může být také příčinou posunu ostatních zubů a neposledně vést k psychickým problémům. V dnešní době samozřejmě existuje několik metod jak ztracený zub nahradit použitím zubních implantátů, korunek, můstků či snímací protézy. Všechny tyto náhrady jsou ovšem umělé a ne zcela bez dalších možných komplikací. Vývoj biologického materiálu, který by plnohodnotně nahradil zub, by byl určitě nejlepší terapií. K takovému objevu vede ještě jistě dlouhá cesta, avšak již dnes je zřejmé, že má tato tkáň velký potenciál v regenerativní medicíně i tkáňovém inženýrství.

Tkáňové inženýrství obecně zahrnuje identifikaci vhodných buněk, vývoj oporných struktur (scaffold) a studium morfogenetických signálů schopných indukovat regeneraci tkáně či orgánu. Dentice je proto velmi vhodným modelem, neboť je k ní snadný přístup, a také je podle současných poznatků bohatým zdrojem mezenchymových kmenových buněk. Je známo, že tyto kmenové buňky mají potenciál diferencovat do mnoha typů buněk jako jsou odontoblasty, osteoblasty, nervové buňky, chondrocyty a adipocyty (Meirelles a Nardi, 2009).

Mezenchymové buňky jsou dnes asi nejprozkoumanější a nejlépe dostupné kmenové buňky v buněčné terapii (Estrela et al., 2011). Mohou být izolovány z pupečníku, kostní dřene, svalů či tukové tkáně. Díky mezenchymovým kmenovým buňkám jsou dnes úspěšně léčeny různé choroby jako některé druhy leukemie (Ikehara, 2002). V budoucnu se předpokládá objevení způsobu léčby různých degenerativních onemocnění např. Parkinsonovy choroby či diabetu 1. typu.

Nejvýhodnější z hlediska získání a vlastností byly donedávna embryonální kmenové buňky. Jsou to buňky pluripotentní a mohou se vyvinout v téměř jakoukoliv buňku v těle (Thomson et al., 1998). Používání těchto buněk je nicméně stále spojeno s etickými a právními otázkami. Z tohoto hlediska je mnohem vhodnější aplikace adultních (dospělých) kmenových buněk. Proto bylo a je cílem vědeckých skupin objevit vhodný zdroj těchto buněk přímo u pacientů.

Jedním z nových zdrojů kmenových buněk jsou **indukované pluripotentní kmenové buňky (iPS buňky)** (Takahashi a Yamanaka, 2006), což jsou uměle připravené kmenové buňky, které vznikly z adultních somatických buněk pacienta (např. z buněk kůže, žaludku či jater jedince). iPS buňky jsou podobné embryonálním kmenovým buňkám, ale liší se specifitou buněk konkrétního jedince, což by v praxi bylo výhodné z hlediska zabránění imunitní odpovědi. Tvorba iPS buněk může ovšem přinášet i rizika, která limitují jejich využití pro člověka. Při jejich tvorbě se totiž používají virové konstrukty nesoucí protoonkogeny, které při aktivaci vyvolávají rakovinné bujení. Izolace tkáňových buněk přímo z orgánu/tkáně nebo z buněk se stejnou vývojovou historií nabízí možnosti personalizované medicíny, a zároveň použití buněk ze stejného tkáňového a vývojového kontextu výrazně snižuje rizika aktivace protoonkogenů.

Kmenové buňky můžeme najít v různých částech lidského těla pouze ve speciálním mikroprostředí neboli „niché“. V současné době je známo několik niché mezenchymových kmenových buněk v dentální oblasti. Jsou to zubní dřev v sekundární dentici (Gronthos et al., 2000), zubní dřev přirozeně extrahovaných mléčných zubů (Miura et al., 2003), periodontální ligamenta (Seo et al., 2004), apikální papily (Sonoyama et al., 2006), dentální folikuly (Morsczeck et al., 2005) a periost maxilárních drsnatin (Cicconetti et al., 2007). Kmenové buňky v dentální oblasti se mohou uplatnit při tvorbě zubní tkáně *in vitro* a obnově zubu při jeho porušení. V budoucnu mohou být také zdrojem mezenchymálních kmenových buněk vhodných pro regeneraci kostní či nervové tkáně (D' Aquino et al., 2008; Király et al., 2011; Ibarretxe et al., 2012). Současně je snahou objevit také vhodný zdroj epitelových kmenových buněk pro tvorbu skloviny.

## 4 Cíl práce

Studium vývoje a dalšího osudu rudimentárních struktur s odontogenním potenciálem je důležité, protože tyto struktury by mohly sloužit jako model pro řízenou zubní regeneraci jak na myších tak i u člověka, kde byly také popsány (Hovorakova et al., 2005, 2007).

**Cílem mého diplomového projektu bylo studium osudu specifické buněčné populace epitelu rudimentárního zubního primordia v myší mandibule, které má během embryogeneze odontogenní potenciál, ale dále je jeho vývoj zastaven.**

Jako modelový systém byla vybrána buněčná populace zubního primordia MS, která v období jeho maximálního rozvoje vykazuje krátkodobě *Shh* expresi (Prochazka et al., 2010). Primordium MS se začíná vyvíjet stejným způsobem jako normální zárodek zubu, ale záhy degeneruje. Dle morfologických studií je toto primordium přeměněno v epitelový val anteriorně před prvním molárem, na rozdíl od rudimentárního primordia R2, které se včleňuje do prvního moláru (Viriot et al., 2000; Peterková et al., 2000).

Nejprve jsme stanovili nulovou a alternativní hypotézu o dalším osudu této specifické buněčné populace:

**H<sub>0</sub>: Buněčná populace *Shh* signálního centra primordia MS dále nepřetrvává během dalšího prenatalního období ani postnatálně.**

**H<sub>1</sub>: Část buněčné populace *Shh* signálního centra primordia MS přetrvává během dalšího prenatalního období a nalezneme ji i u postnatálních jedinců.**

V případě vyvrácení nulové hypotézy budeme buňky analyzovat pomocí různých metodických přístupů, které by měly zodpovědět na následující otázky:

1. Jaký je další osud buněk, které exprimují gen *Shh* v době signální aktivity centra MS?  
Přetrvává tato populace buněk dále v epitelu?
2. Jaké je cílové umístění těchto buněk v adultní tkáni?
3. Vykazuje tato populace buněk proliferační aktivitu?

4. Mají tyto buňky zachovaný zubní vývojový program v podobě exprese markerů tkáňových kmenových buněk, případně exprese genů pro strukturální proteiny?
5. Lze tyto buňky izolovat a dále kultivovat a liší se potom od buněk *in vivo*?

**Populaci buněk primordia MS, které v době jeho rozvoje exprimují *Shh*, a jejich potomků z praktických důvodů dále uvádíme pod zkratkou RTSCD buňky. Kvůli plánované publikaci jsme pro tyto buňky zvolili anglický název: rudimentary tooth signaling center derived cells (princip značení buněk viz kapitola 5. Materiál a metody).**





Výsledek Cre-lox rekombinace je určen orientací a polohou lox-p míst. Cre rekombináza tak může způsobit inverzi, translokaci nebo delecí daného úseku. Cre ani loxP místa nejsou přirozeně součástí myšího genomu, a tak je potřeba vygenerovat transgenní myši. Cre a loxP myší kmeny jsou vždy vyvinuty odděleně a po vybraném křížení vznikne Cre-lox kmen, který můžeme experimentálně využít (Nagy, 2000). Dostupné jsou různé typy kmenů:

- **kmeny exprimující Cre,**
- **LoxP kmeny (floxed):** obsahují loxP místa obklopující danou sekvenci – využití pro kondiciované knockouts, knockiny nebo tzv. aktivační (gain of function) mutace,
- **Cre reportérové kmeny:** obsahují loxP místa, obklopující transkripční represor, následovaný fluorescenčním či enzymatickým markerem, např. *LacZ*.

K experimentům bylo využito několik transgenních myších kmenů. Jejich celé i obecné názvy jsou uvedeny v tabulce 1. Ke genotypizaci byl použit standardní protokol společnosti Jackson Laboratory.

Název kmenu*	Obecný název
B6.129S6- <i>Shh</i> <sup>tm2(cre/ERT2)Cjt</sup> /J	<i>Shh</i> CreER
B6.129S- <i>Shh</i> <sup>tm1(EGFP/cre)Cjt</sup> /J	<i>Shh</i> Cre
B6.129S4- <i>Gt(ROSA)26Sor</i> <sup>tm1Sor</sup> /J	Rosa26R- <i>LacZ</i>
B6.129(Cg)- <i>Gt(ROSA)26Sor</i> <sup>tm4(ACTB-tdTomato-EGFP)Luo</sup> /J	mT/mG
STOCK <i>Gt(ROSA)26Sor</i> <sup>tm1(CAG-Brainbow2.1)Cle</sup> /J	R26R- <i>Confetti</i>

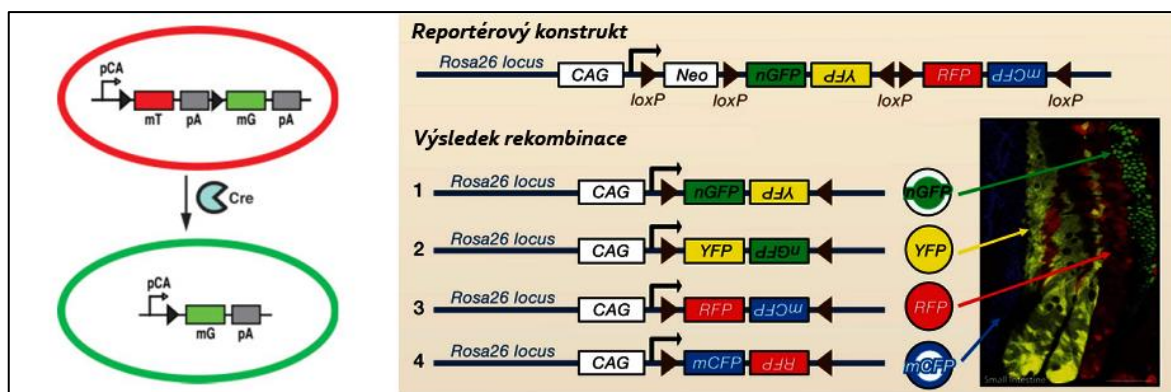
**Tabulka 1.** Vlevo názvy kmenů dle Jackson Laboratory (<http://jaxmice.jax.org/>), vpravo obecně užívaný název kmenu.

Transgenní myši byly zakoupeny v Jackson Laboratory (Maine, USA). mT/mG a R26R-*Confetti* myší kmeny byly použity pouze v rámci mé zahraniční stáže na Kalifornské univerzitě v San Francisku (UCSF).

**mT/mG** je transgenní kmen, kde každá buňka produkuje membránově vázaný červený fluorescenční protein (tdTomato). Po aktivaci Cre rekombináзой je odstraněna sekvence

tdTomato spolu s represorem membránově vázaného GFP, a tím nahrazena membránově vázanou zelenou fluorescencí mtEGFP (Muzumdar et al., 2007). Tento kmen je velice vhodný pro časosběrnou fluorescenční a konfokální mikroskopii, neboť umožňuje zřetelně označit konkrétní buňky i okolní tkáň.

Dále byl použit kmen **R26R-Confetti**, což je transgenní systém, kde je náhodně aktivován (opět pomocí Cre rekombinázy) jeden ze čtyř fluorescenčních proteinů – azurový fluorescenční protein (CFP), zelený fluorescenční protein (GFP), žlutý fluorescenční protein (YFP) a červený fluorescenční protein (RFP) (Snippert et al., 2010). Tento systém je proto velmi přínosný pro sledování klonality buněk uvnitř populace jak ve tkáni, tak v buněčné kultuře. Schéma obou transgenních systémů viz obr. 9.



**Obr. 9. Schéma principu mT/mG a R26R-Confetti transgenního reportérového kmenu.** Vlevo: po aktivaci odstraní Cre rekombináza sekvenci tdTomato (mT), která je nahrazena membránově vázanou zelenou fluorescencí mtEGFP (mG). Vpravo: R26R-Confetti je transgenní systém, kde je náhodně pomocí Cre rekombinázy aktivován jeden ze čtyř fluorescenčních proteinů (upraveno podle Muzumdar et al., 2007; Snippert et al., 2010).

Myši byly připouštěny vždy přes noc. Ráno pak pomocí přítomnosti vaginální zátky lze určit, které samice jsou pravděpodobně březí. Následující poledne je pak považováno za embryonální den 0,5. V případě, že se jednalo o inducibilní Cre myši kmeny (křížení různých reportérových kmenů s *Shh*CreER myšmi), bylo nutné těmto myším v 11,5 embryonálním dni (respektive 11,7 ED) aplikovat intraperitoneálně dávku tamoxifenu k aktivaci CreER rekombinázy (a následného označení populace buněk exprimující *Shh*). Jedna dávka představuje 9 mg tamoxifenu (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) na 40g hmotnosti samice, který se pomocí sonikátoru rozpustí v 300 µl kukuřičného oleje. Dávka se tedy upravuje podle hmotnosti samice. Březí samice byly usmrceny cervikální dislokací

a embrya na ED 12,5; 13,5; 14,5 či 15,5 byla vyjmuta z uteru a ihned zpracována (přehled zpracovaného materiálu viz tabulka 2).

mT/mG a R26R-*Confetti* embrya byla tříděna podle přítomnosti fluorescenčního signálu (ve folikulech budoucích fousů myši či na jazyku) na invertovaném fluorescenčním mikroskopu (Leica DM5000B, Wetzlar, Německo) či fluorescenční lupě (Leica MZ16F, Wetzlar, Německo), (obr. 10.). Dále byla využita vždy jen fluorescenčně pozitivní embrya. Pro snímání buněčné populace pod různými mikroskopy se vždy musela izolovat dolní čelist embrya a vypreparovat oblast čelisti od distálního konce moláru až k řezáku. Při experimentech s adultními jedinci (stáří 1 a 5 týdnů) byly myši usmrčeny rovněž cervikální dislokací, dále jim byla vypreparována dolní čelist, která byla následně použita k dalšímu zpracování.



**Obr. 10. Třídění embryí.** Transgenní embrya byla nejprve tříděna podle přítomnosti fluorescenčního signálu – na obrázku vypreparovaná dolní čelist a výrazný pozitivní signál exprese *Shh* na celém jazyku (z *ShhCreER* x R26R-*Confetti* křížení).

křížení	stáří	experiment	metoda	počet
CD1	14,5ED	detekce proliferace	značení BrdU	1
<i>Shh</i> ERCre x Confetti	14,5ED	lineage tracing	konfokální, časosběrná mikroskopie	2
<i>Shh</i> ERCre x mT/mG	12,5;13,5;14,5 ED	lineage tracing	časosběrná mikroskopie	4
<i>Shh</i> Cre x Confetti	1 týden	lineage tracing, analýza exprese	konfokální mikroskopie, kultivace, qPCR	1
	1 měsíc			1
<i>Shh</i> ERCre x RosaLacZ	15,5ED	lineage tracing	značení lacZ buněk	3

**Tabulka 2. Přehled zpracovaného materiálu**

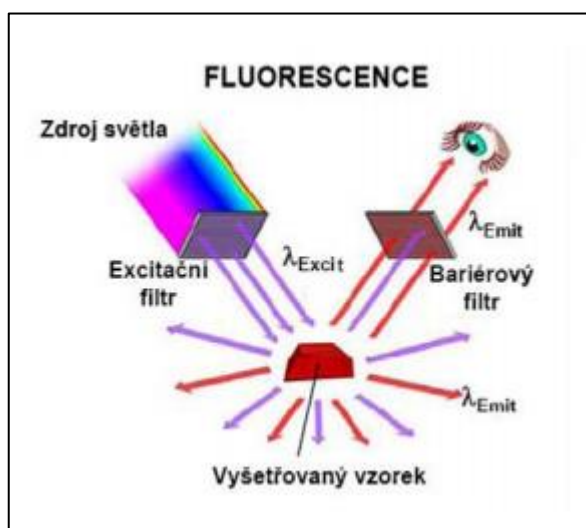
## 5.2 Značení *Shh* exprimujících buněk, histologie

Ke značení *Shh* exprimujících buněk pomocí *Lac-Z* genu bylo potřeba připouštět transgenní samce *Shh*CreER a samice Rosa26R-*LacZ*. Březí samici Rosa26R-*LacZ* bylo na ED 11,5 aplikováno 2,4 mg tamoxifenu k aktivaci CreER rekombinázy. Samice byly usmrceny cervikální dislokací a embrya v ED 15,5 byla po vyjmutí z uteru zvážena k upřesnění vývojového stadia (Peterka et al., 2002). Hlavičky embryí byly poté fixovány v 4% PFA (paraformaldehyd v PBS) po dobu 20 minut. Poté byly barveny roztokem X-galu v inkubátoru při teplotě 37 °C cca 24 hodin. Vzorky byly dále uchovávány v 4% PFA. Čelisti byly postfixovány v roztoku Bouin (min. 2 týdny) a poté zality do parafínu a krájeny na frontální řezy (10 µm) dle standardního protokolu. Řezy byly následně barveny jádrovou červení.

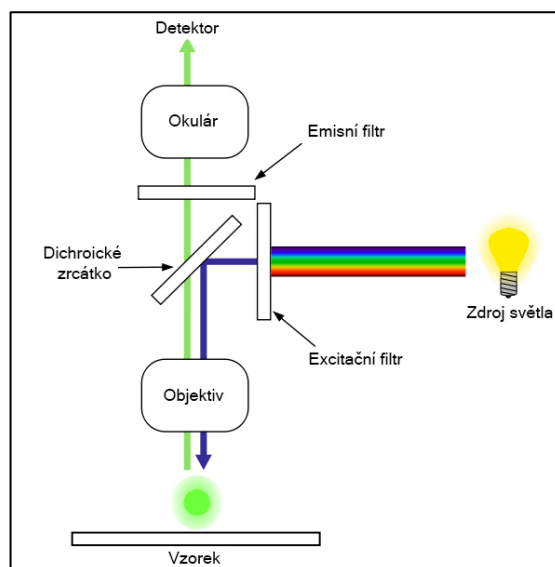
## 5.3 Fluorescenční mikroskopie

Ke snímání fluorescenčně značené živé tkáně je nezbytné použít fluorescenční mikroskop. Fluorescenční mikroskop je podobný klasickému světelnému mikroskopu, doplněný o silnější zdroj světla a dva filtry – **excitační** a **bariérový**. Excitační filtr dovolí prostupu světla ke vzorku jen o vybrané vlnové délce. Od preparátu se odráží emitované světlo, které prochází bariérovým filtrem. Jím pak proniká pouze emitované světlo, viditelné jako signál na černém pozadí (schéma viz obr. 11.). Fluorescenční mikroskopy můžeme rozdělit na **transmisní** či **epifluorescenční**. U transmisního fluorescenčního mikroskopu prochází světlo excitačním filtrem a na vzorek dopadá ze spodu, jako

u klasického světelného mikroskopu. Součástí mikroskopu je tzv. zástinový kondenzor, který odráží světlo tak, že dopadá na preparát z boku, a excitační světlo tak prochází mimo objektiv. U epifluorescenčního mikroskopu prochází excitační světlo objektivem. Světlo dopadá na preparát ze shora a vrací se zpět do objektivu. Aby se do okuláru dostalo jen emitované světlo určité vlnové délky, je zapotřebí použít tzv. dichroické zrcátko (schéma viz obr. 12).



**Obr. 11. Princip fluorescenčního mikroskopu** (převzato z <http://www.bc.cas.cz/doc/ekotech/study/Fluorescenci-a-konfokalni-mikroskopie.pdf>)



**Obr. 12. Schéma epifluorescenčního mikroskopu** (převzato z [https://en.wikipedia.org/wiki/File:FluorescenceFilters\\_2008-09-28.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/File:FluorescenceFilters_2008-09-28.svg))

### 5.3.1 Konfokální mikroskopy

Konfokální mikroskop se od fluorescenčního liší zejména svou rozlišovací schopností, danou detekcí světla pouze z ohniskové roviny. Je vhodný pro pozorování živé tkáně včetně vzorků větších rozměrů, kde je několik vrstev buněk. Existují dva základní typy konfokálních mikroskopů – **rastrovací mikroskop** a **mikroskop s rotujícím diskem**.

U rastrovacího konfokálního mikroskopu je zdrojem excitačního světla laser o určité vlnové délce, který prochází nejprve první bodovou clonkou, tzv. „**pinhole**“, která odfiltruje neostřý signál. Dichroické zrcátko, excitační i bariérový filtr plní podobnou funkci jako u epifluorescenčního mikroskopu (viz výše). Před detektorem (fotonásobič propojen s počítačem) je umístěna druhá bodová clonka. Tato clonka odfiltruje emitované světlo, které pochází ze vzorku mimo ohniskovou rovinu (tzv. out-of-focus).

Obraz celé zaostřené roviny lze získat rastrováním pomocí rozmítání laserového paprsku. K tomu většinou slouží dvě otočná řádkovací zrcadla či pohyblivé dichroické zrcátko. Počítač, napojený na detektor, dostává souřadnice jednotlivých bodů, až vytvoří kompletní obraz v různých ohniskových rovinách (schéma viz obr. 13.). Z finálního výstupu konfokálního mikroskopu je možné také rekonstruovat 3D zobrazení vzorku.

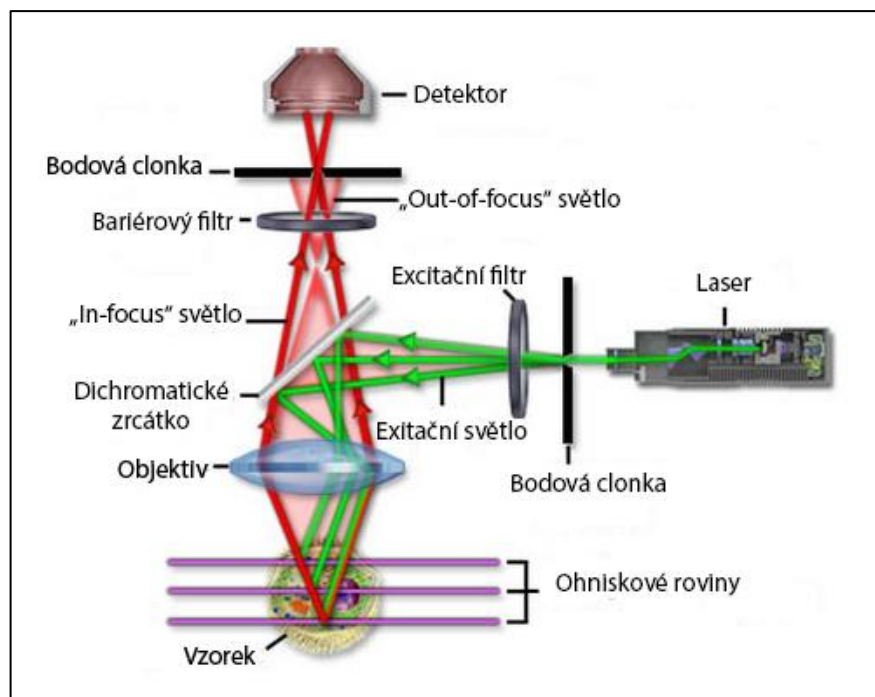
Druhým typem je konfokální mikroskop s rotujícím diskem (schéma viz obr. 14.), který místo skenujícího zařízení obsahuje 2 rotující kotouče. Laser nejprve projde prvním kotoučem obsahujícím 20 000 mikro čoček, poté prochází druhým diskem, tzv. **Nipkowovým kotoučem**, na kterém je mnoho navzájem oddělených bodových clonek. Obraz je snímán skrz cca 1000 pinhole v jednom momentu (za méně než 1 milisekundu).

### 5.3.2 Mikroskopické snímání a časosběrná mikroskopie

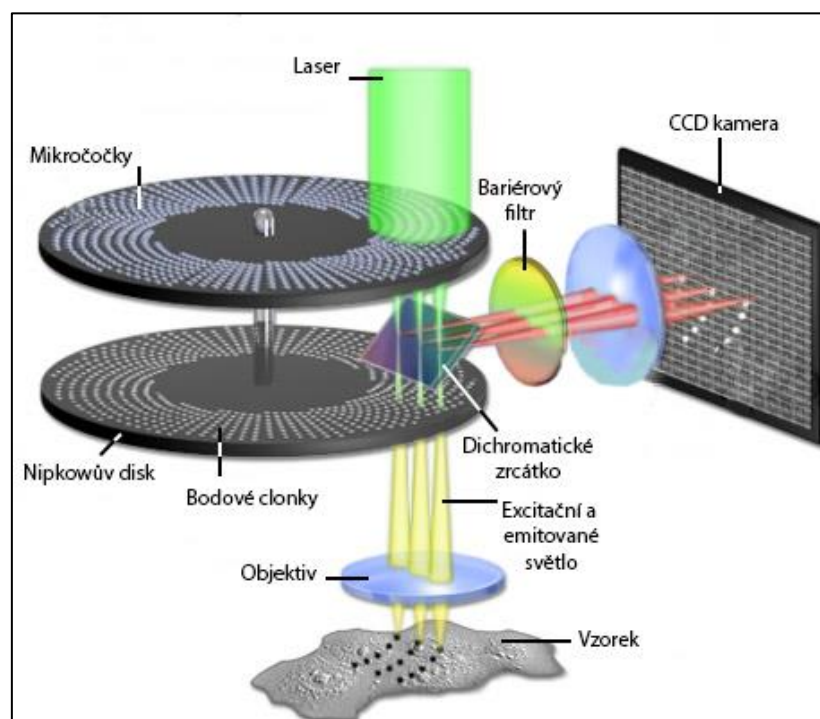
Pro snímání živé tkáně pomocí fluorescenčního či konfokálního byly použity transgenní myši Cre-kmeny *ShhCreER* či *ShhCre* a reportérové kmeny **mT/mG** a **R26R-Confetti** (kompletní názvy a princip viz výše).

Březí samici byla aplikovaná dávka tamoxifenu (9 mg na 40g myš) v ED 11,5 (či lépe na 11,7 ED) k aktivaci CreER rekombinázy v době, kdy dochází k expresi *Shh* v epitelu signálního centra MS (více viz publikace Prochazka et al., 2010). Embrya byla dále odebrána ve stáří 12,5; 13,5 či 14,5 ED, (postnatální jedinci ve stáří 1 a 5 týdnů.)





Obr. 13. Schéma konfokálního rastrovacího mikroskopu (převzato z <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/spinningdisk/introduction.html>)



Obr. 14. Schéma konfokálního mikroskopu s rotujícím diskem (převzato z <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/spinningdisk/introduction.html>)



K pozorování buněk signálního centra bylo nejprve potřeba vypreparovat dolní čelist embrya, případně pouze část od distálního konce moláru M1 až k řezáku. Následně byla tato tkáň zalita kultivačním médiem. Vzorek byl poté snímán pod konfokálním mikroskopem (Leica SP5, Wetzlar, Německo) pro účely identifikace *Shh* exprimujících buněk při větším rozlišení a porovnání s *LacZ* značením. K časosběrné mikroskopii živé tkáně byl použit konfokální mikroskop s rotujícím diskem (Nikon, Tokio, Japonsko) s konfokální hlavou (Yokogawa, Tokio, Japonsko) a CMOS kamerou Clara (Andor, Belfast, Severní Irsko). Snímání probíhalo vždy přes noc, tj. od cca 18.00 do 9.00 následujícího dne.

## 5.4 Detekce proliferace pomocí BrdU

Bromodeoxyuridin (neboli 5-bromo-2'-deoxyuridine, BrdU) je syntetický nukleosid (analog tymidinu) běžně užívaný k detekci proliferace buněk v živé tkáni. BrdU se může inkorporovat do nově syntetizované DNA nebo do replikujících se buněk v S fázi buněčného cyklu. Pomocí BrdU-specifických protilátek můžeme poté tyto buňky imunofluorescenčně značit.

### Protokol značení BrdU:

- K experimentu byla použita březí CD1 myš, které bylo intraperitoneálně aplikováno 50mg/1g samice BrdU. Po dvou hodinách byla myš usmrcena a dále použita embrya ve stáří 14,5 ED. Hlavy embryí byly umístěny do PBS obsahující 2mM EDTA.
- Vzorek byl poté 2 hodiny fixován v 4% PFA (paraformaldehyd) na třepačce při teplotě 4 °C.
- Poté promyt v PBT (PBS obsahující 0,1% Tween-20) 1 hodinu.
- Dále byl vzorek umístěn do 100% metanolu a skladován v mrazáku při -20 °C (přes noc i déle).
- Po vyjmutí z mrazáku bylo potřeba vzorky re-hydratovat pomocí série roztoku metanol/PBT v poměru (4:1, 1:1, a 1:4) a následného 3x promytí v PBT.

- K lepšímu pronikání anti-Brdu protilátky buněčnou membránou byl dále vzorek třepáný v roztoku 20 $\mu$ g Proteinázy K (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) v PBT po dobu 7 minut při teplotě 37 °C.
- Za účelem zastavení působení Proteinázy K byl poté vzorek 2x promyt v PBT, fixován 20 minut v 4% PFA při pokojové teplotě a znovu 3x promyt v PBT.
- K denuraci DNA byl vzorek následně dvakrát promyt 2N HCl (obsahující Tween-20), ve 2N HCl hodinu třepán a poté promyt PBT (5 min).
- Poté byl vzorek třepán 1 hodinu v blokovacím roztoku (Animal free blocker (Vector, Burlingame, USA))
- Dále byla do blokovacího roztoku přidána primární protilátka (rat-anti-BrdU (Abcam 6323, Cambridge, Anglie) 1:500 => 2 $\mu$ l:1000 $\mu$ l blokovacího roztoku).
- Inkubace protilátkou probíhala přes noc.
- Následující den byl vzorek nejdříve 3x promyt v PBS (10 min.) a poté inkubován v blokovacím roztoku s obsahem sekundární protilátky 1:500 (anti-rat biotinylovaná protilátka (Vector, Burlingame, USA) po dobu 1-2 hod.
- Vzorek byl dále 3x promýván (vždy po 10 min.), mezitím byl připraven roztok ABC ((Vectastain® Elite® ABC Kit, (Vector, Burlingame, USA) 2,5 ml BSA 5%, 1 kapka A, jedna kapka B, smícháno a necháno při pokojové teplotě 30 min.))
- K zesílení značení byl vzorek následně přemístěn do roztoku ABC ((Avidin/Biotinylated enzyme Complex, (Vector, Burlingame, USA)) na 1,5 hod při pokojové teplotě.
- Poté byl 3x promyt PBS (po 10 min.).
- K fluorescenčnímu značení HRP-sekundární protilátky bylo použito 20 $\mu$ l TSA-Cy3 (1:100) (Perkin-Elmer, Waltham, USA) 30 min.
- Vzorek se poté promyl 3xPBS a byl uložen pro další zpracování ve 100% glycerinu (přes noc).

- Před pozorováním na konfokálním mikroskopu byla buněčná jádra značena fluorescenční barvičkou DAPI (Invitrogen – Molecular Probes, Carlsbad, USA).

## 5.5 Buněčné kultury

### 5.5.1 Příprava buněčných kultur

Pro kultivaci izolovaných živých RTSCD buněk, bylo potřeba nejdříve připravit dostatečné množství MEF (mouse embryo fibroblast) buněk, sloužících jako výživná podpurná vrstva (neboli tzv. Feeder layer). Při postupu je nutné dodržovat velmi sterilní prostředí, např. pracovat v laminárním boxu sterilizovaném UV zářením a před prací v boxu rukavice otírat etanolem. V experimentu byly použity primární MEF buněk (EmbryoMax, Millipore, Billerica, USA), které byly uchovávány v tekutém dusíku. medium

#### 5.5.1.1 *Namnožení MEF buněk*

- Do kultivační lahve (Thermo Scientific Biolite, Waltham, USA) bylo napipetováno 20 ml želatiny a ponecháno při pokojové teplotě min. 1 hodinu. (Kultivační lahve je možné nejprve ošetřit kultivační 0,1% želatinou (StemCell, Vancouver, Kanada), při následném pasážování se buňky lépe odstraňují z povrchu lahve.)
- Po této době se přebytečná želatina odstranila.
- V experimentu bylo použito  $2 \times 10^6$  primárních MEF buněk.
- Nejprve bylo nutné buňky ve zkumavce rychle rozmrazit ve vodní lázni (37 °C) po dobu cca 2 minut.
- Poté bylo do stejné zkumavky k MEF buňkám přidáno 1 ml kultivačního MEF media (předehřátého na 37 °C), složení média:
  - 360 ml DMEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA),
  - 90 ml M199 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA),
  - 50 ml FCS (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).
- Následně byl obsah zkumavky centrifugován (4 min./800 RPM).

- Supernatant byl pipetou odstraněn a buňky byly resuspendovány v novém MEF mediu a přemístěny do kultivační lahve (na lahev 175 cm<sup>2</sup> cca 25 ml média).
- Kultivace buněk probíhá v kultivačních lahvích umístěných v inkubátoru po dobu 3-5 dní při t. 37 °C v 5% CO<sub>2</sub>. Při pomalejším růstu bylo po 2-3 dnech v lahvi vyměněno kultivační medium.

#### **5.5.1.2 Pasážování buněk**

V okamžiku, kdy MEF buňky porostou celé dno kultivační lahve, můžeme přejít k pasážování buněk, tj. přemístění buněk do dalších třech lahví.

- Nejdříve bylo odsáto kultivační medium a poté byly buňky propláchnuty PBS.
- Následně bylo do lahve přidáno 15 ml tkáňového 0,05% trypsinu (Life Technologies Gibco, Carlsbad, USA), předehřátého na 37 °C. Kultivační lahev byla poté umístěna na 5 min. do inkubátoru při t. 37 °C. (Tkáňový trypsin slouží k odloučení buněk ode dna kultivační lahve.)
- K inhibici tkáňového trypsinu bylo do lahve přidáno stejné množství (15 ml) kultivačního media.
- Poté byly buňky přemístěny do zkumavky a stočeny na centrifuze (4 min./800 RPM).
- Supernatant byl odstraněn a k buňkám bylo přidáno nové kultivační médium.
- Následně byly buňky rozděleny do nových tří lahví a do každé lahve bylo doplněno medium do celkového obsahu 25 ml média/lahev.
- Kultivace probíhala obdobně jako v prvním kroku, tedy cca 3-5 dní při t. 37 °C v 5% CO<sub>2</sub>.

#### **5.5.1.3 Sklizení a zamrazování buněk**

Když buňky porostou celé dno lahví stejně jako při primárním namnožení buněk, může se přejít ke sklizení a uchování buněk. K inaktivaci mitotické aktivity MEF buněk se používá roztok Mitomycinu C (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

- Z lahví bylo nejdříve odsáto kultivační medium.
- Poté byl přidán roztok Mitomycinu C (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) a kultivačního média (0,5 ml roztoku Mitomycinu C a 25 ml kultivačního media).
- Roztok Mitomycinu byl připraven smícháním 2mg Mitomycinu C a 4 ml sterilní vody.
- Lahve byly potom uloženy do inkubátoru na minimálně 3 hodiny.
- Poté bylo medium odsáto a buňky propláchnuty PBS.
- Dále byl k buňkám přidán 0,05% trypsin (Life Technologies Gibco, Carlsbad, USA) (5 min. při t. 37 °C) a obdobně jako při pasážování bylo přidáno stejné množství média pro inhibici trypsinu.
- Následně bylo možno buňky spočítat. Tento proces se provádí pomocí hemocytometru. V počítací komůrce bylo spočítáno, kolik buněk se nachází ve 3 různých čtvercích, výsledek zprůměrován a dosazen do vzorečku:

$$x = \text{průměrný počet buněk ve čtverci} \times 10^4 \times \text{ml původního roztoku.}$$

- Buňky byly poté stočeny (4 min./800 RPM), medium odsáto a přidáno medium zmrazovací tak, aby v 1 ml bylo  $10^6$  buněk. Zmrazovací medium se připravuje čerstvý (a chlazený na ledu) z 45 ml FBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) a 10 ml DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Alikvoty buněk (1 ml) se dále skladují v tekutém dusíku.

### 5.5.2 Kultivace

Ke studiu dalších vlastností RTSCD buněk byly tyto buňky izolovány z mandibuly postnatálních jedinců (stáří 1 a 5 týdnů). Buňky byly fluorescenčně značené pomocí křížení transgenních kmenů *ShhCre* a *R26R-Confetti*. Po usmrcení jedince byla vypreparovaná dolní čelist a pod fluorescenční lupou byly vypreparovány značené RTSCD buňky. Tyto buňky byly kultivovány na vrstvě MEF buněk cca 1 týden. Kultivované buňky byly dále zpracovány pomocí epifluorescenčního mikroskopu a Real-time qRT PCR.

## 5.6 Real-time qRT PCR

K analýze genové exprese byla použita metoda **Real-time qRT PCR (Real-Time quantitative Reverse Transcription PCR)**, tedy kvantitativní PCR v reálném čase. Tato technologie umožňuje detekci a kvantifikaci exprimovaných genů (mRNA) z izolovaného buněčného materiálu. Během každého cyklu PCR je pomocí fluorescenčních barviv či sond měřena fluorescence, která je úměrná k množství daného genu ve vzorku. Kvantifikace se dále provádí prostřednictvím analýzy amplifikačních křivek vzniklých vynesením naměřené fluorescence oproti pořadovému číslu příslušného cyklu (Heid et al. 1996).

V naší analýze byla z fluorescenčně značené populace RTSCD buněk (postnatální jedinec a buněčné kultury) nejprve izolovaná RNA a dále provedena dvoukroková Real-time qRT PCR, která se skládá z:

- přepsání RNA do cDNA pomocí reverzní transkripce,
- samotné Real-time PCR.

### 5.6.1 Izolace RNA

Z fluorescenčně značené populace RTSCD buněk z tkáně dospělého a kultur (*ShhCre* x *R26R-Confetti*) byla izolovaná RNA pomocí **RNeasy mini kitu** (Qiagen, Hilden, Německo). Tato technologie využívá vlastnost křemíkové membrány vázat RNA. Vzorky jsou nejprve lyzovány a homogenizovány pufrem, který inaktivuje RNázy. Dále je přidán ethanol pro zajištění vhodných vazebných podmínek a vzorek je přemístěn do kolonky (RNeasy Mini spin kolonka). RNA se v kolonce pomocí síly centrifugy naváže na membránu a ostatní kontaminace je vymyta. Získaná RNA je poté naředěna vodou.

#### **Protokol izolace RNA pomocí RNeasy mini kitu (Qiagen, Hilden, Německo)**

- Po odebrání živých RTSCD buněk k nim bylo nejprve zapotřebí přidat RNAlater ke stabilizaci RNA. Takto bylo možné vzorek i déle uchovávat (při -70 °C).
- Dále byl vzorek centrifugován a supernatant odpipetován.
- K peletce bylo přidáno 350 µl pufru RLT. (Do pufru bylo nejprve přidáno 3,5 µl β-merkaptoethanolu kvůli inaktivaci RNáz).

- K homogenizaci buněk byl použit Qiashredder homogenizer (Qiagen, Hilden, Německo).
- K roztoku bylo poté přidáno stejné množství 70% etanolu.
- Obsah zkumavky byl přemístěn do kolonky (součástí kitu) a centrifugován 15 s.
- Poté byla do kolonky přidána DNáza (10 µl DNázy + 70 µl pufru RDD).
- Dále bylo do kolonky přidáno 700 µl pufru RW1 a centrifugováno 15 s.
- Poté byl přidán pufr RPE (500 µl), centrifugováno 15 s.
- Následně byl podruhé přidán pufr RPE (500 µl), centrifugováno 2 min.
- Poté byl obsah sběrné zkumavky přemístěn do nové a centrifugován na plnou rychlost 1 min.
- Nakonec byl vzorek přemístěn do nové kolonky a zředěn „RNase-free“ vodou (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) (30-50 µl). Koncentrace RNA byla změřena pomocí nanodropu (Fisher Scientific, Hampton, USA).

### 5.6.2 Reverzní transkripce

Reverzní transkripce je enzymová reakce, při níž dochází k přepisu z RNA do DNA, kterou označujeme jako cDNA (complementary DNA). Tato reakce je katalyzována enzymem reverzní transkriptáza a produkt poté dále namnožen pomocí PCR.

Do reakční zkumavky byly přidány následující složky:

- 5x pufr (Promega, Madison, USA) – 4 µl
- dNTP – volné nukleotidtrifosfáty (Thermo scientific, Waltham, USA) – 1,5 µl
- hexaprimery (Roche, Basilej, Švýcarsko) – 1 µl
- inhibitor RNáz (New England biolabs, Ipswich, USA) – 0,5 µl
- 100 µg RNA + H<sub>2</sub>O – 12 µl

Zkumavka byla přemístěna do RT cyklieru (Eppendorf, Hamburg, Německo) a po prvním programu byla do reakce přidána reverzní transkriptáza (1 µl, Promega, Madison, USA). Produkt byl dále přidán do Real-time qPCR reakce.

### 5.6.3 Real-time qPCR

Do 96 jamkové destičky byly přidány jednotlivé složky reakce vždy v tripletech pro každý gen v množství:

- **master mix** (Promega, Madison, USA) – 6 µl,
- **H<sub>2</sub>O** – 2,8 µl, **primer** – 1,2 µl
- **cDNA** – 2 µl.

Jako pozitivní kontrola byl použit tzv. House keeping gen *L19* (mitochondriální ribozomální protein), což je gen exprimovaný ve všech buňkách organismu a ve všech vývojových stádiích. Reakce probíhala vždy také s použitím negativní kontroly (bez přidání DNA). Sekvence primerů *L19*, *Gli1*, *Sox2*, *Bmi1*, amelogeninu a ameloblastinu jsou uvedeny v tabulce 3.

gen	sekvence primeru
<i>L19</i>	R: AAG CCT GTG ACT GTC CAT TC F: GAT CCT CAT CCT TCT CAT CCA G
<i>Gli1</i>	R: TTG AGG TTG GGA TGA AGA AGC F: CTT GTG GTG GAG TCA TTG GAT
<i>Sox2</i>	R: GTA CAA CTC CAT GAC CAG CTC F: CTT GAC CAC AGA GCC CAT
<i>Bmi1</i>	R: TTT TAT GCT GAA CGA CTT TTA ACT TTC F: CTT GAT TCT GGT TGT TCG ATG C
amelogenin	R: GCA TAC ACT CAA AGA ACC ATC AAG F: CAC CTC ATA GCT TAA GTT GAT ATA ACC
ameloblastin	R: GGT GCA CTT TGT TTC CAG GT F: TTC TTG CTT TCC CCA ATG AC

**Tabulka 3. Sekvence primerů**



Real-time qPCR byla provedena na cykleru Realplex2 (Eppendorf, Hamburg, Německo). Program reakce byl následující:

- denaturace při 95 °C po dobu 2 min.,
  - denaturace při 95 °C po dobu 15 s.,
  - annealing při 60 °C po dobu 15 s.,
  - amplifikace při 68 °C po dobu 20 s.,
  - melting, gradient teploty – 60-95 °C.
- } celkem 40 cyklů

Kvantifikace produktu byla provedena relativní komparativní Ct metodou, tedy poměrem ke genu *L19* (Schmittgen a Livak, 2008). Ct je bod, kde se protíná amplifikační křivka s fluorescenčním prahem (threshold, viz obr. 15).

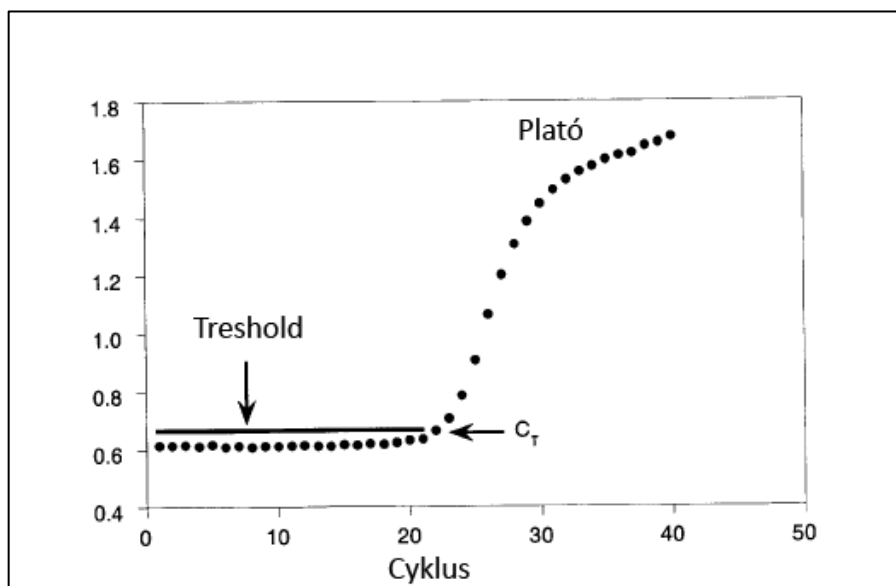
Vzorec výpočtu poměru množství cílového ku referenčnímu genu:

$$R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

kde:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{testovaného vzorku}} - \Delta Ct_{\text{kontrolního vzorku}}$$

$$\Delta Ct_{\text{testovaného vzorku}} = Ct_{\text{cílového (target) genu}} - Ct_{\text{housekeeping genu}}$$



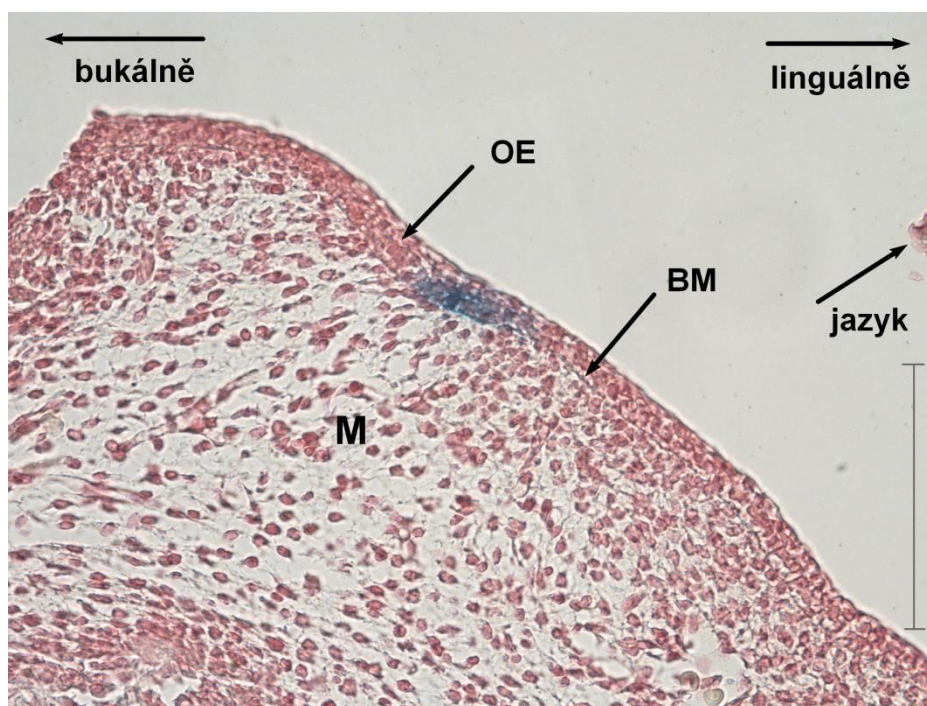
**Obr. 15. Tvar typické amplifikační křivky Real-time qPCR.** Kvantifikace produktu byla provedena relativní komparativní Ct metodou. Ct je bod, kde se protíná amplifikační křivka s fluorescenčním prahem tzv. Threshold (převzato z Heid et al., 1996).

## 6 Výsledky

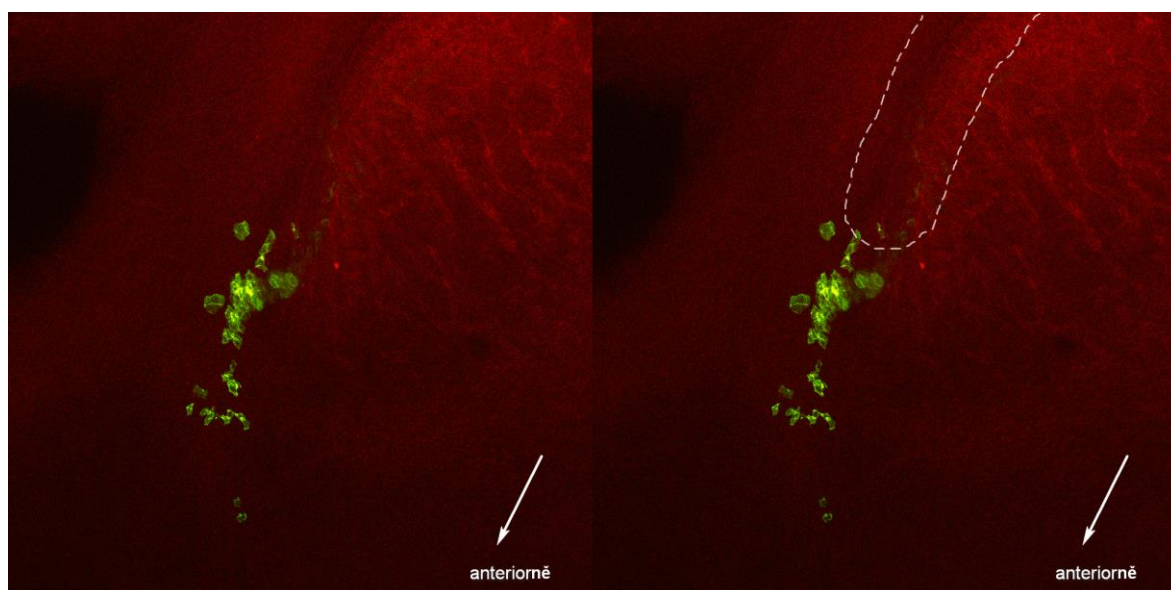
### 6.1 Lokalizace buněk RTSCD buněk

V rámci diplomové práce byla prostřednictvím různých experimentálních metod lokalizována populace RTSCD buněk v průběhu dalšího vývoje. Pomocí křížení *ShhCreER* x *Rosa26R-LacZ* myši a aktivace CreER rekombinázy tamoxifenem na ED 11,7 jsme sledovali osud buněčné populace signální domény primordia MS. Značené buňky byly lokalizovány u embrya (ED 15,5) anteriorně od vyvíjejícího se prvního moláru M1. Mandibula tohoto jedince byla histologicky zpracována (vybraný frontální řez viz obr. 16.)

Obdobně byly kříženy transgenní kmeny *ShhCreER* x mT/mG. Při tomto křížení je v embryu aktivován zelený fluorescenční protein (GFP) v buňkách, kde se v době aktivace tamoxifenem exprimuje gen *Shh*. Ostatní buňky exprimují červený fluorescenční protein (RFP), a vytváří tak vhodné pozadí pro pozorování (je také zřetelně viditelný zárodek M1). Je patrné, že se populace vyskytuje anteriorně před prvním molárem, viz obr. 17.



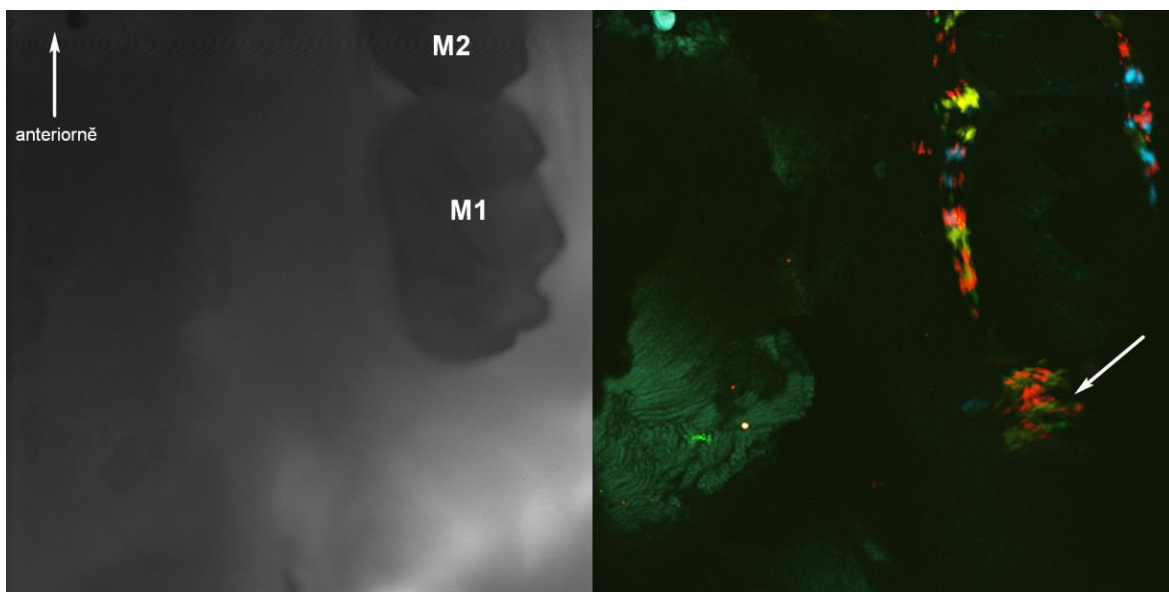
**Obr. 16. Frontální histologický řez mandibulou embrya (318 g) na ED 15,5 v oblasti RTSCD buněk (modře).** U embrya z potomstva křížení *ShhCreER* x *Rosa-LacZ* po pozitivním barvení roztokem X-galu lze detekovat modrou populaci RTSCD buněk po aplikaci 2,4 mg tamoxifenu na ED 11,7. Tato populace se nachází v orálním epitelu (OE), který ohraničuje bazální membrána (BM) od mezenchymu (M), (měřítko 100  $\mu$ m, objektiv 40x, mikroskop Leica DMLB (Wetzlar, Německo)).



**Obr. 17. Lokalizace RTSCD buněk u mT/mG myši.** Oblast primordia moláru M1 v dolní čelisti. U embrya z křížení *ShhCreER* x mT/mG lze po aplikaci 4,5 mg tamoxifenu na ED 11,7 detekovat populaci zelených (exprese mtEGFP) RTSCD buněk. Ostatní buňky exprimují RFP (červeně). Vpravo přerušovanou čarou označen zárodek M1.

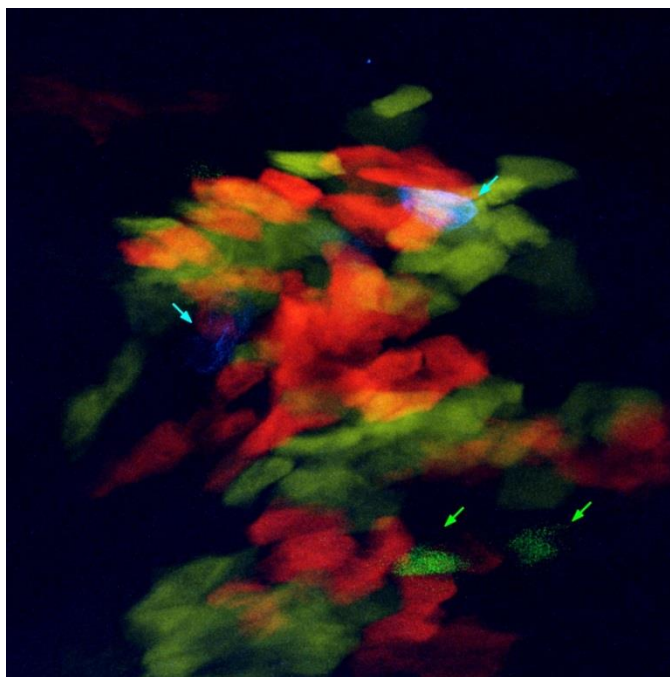
## 6.2 RTSCD buňky přetrvávají také postnatálně

Dále bylo provedeno křížení *ShhCre* x *R26R-Confetti* myších kmenů, kde jsou v potomcích následně označeny všechny buňky, které expimovaly gen *Shh* a jejich buňky dceřiné. Zároveň je v buňkách vždy náhodně aktivován jeden ze čtyř fluorescenčních proteinů, což umožňuje pozorování klonálního původu/růstu RTSCD buněk. U jedince (stáří 5 týdnů) byly fluorescenčně značené buňky přítomny jak v okolí již prořezaných molárů, tedy v gingivě, tak v oblasti před prvním molárem (viz obr. 18.), obdobně jako u embryí z křížení *ShhCreER* x *Rosa26R-LacZ* a *ShhCreER* x mT/mG. V této oblasti byly přítomny buňky exprimující všechny čtyři fluorescenční proteiny (viz detail obr. 19.).



**Obr. 18. RTSCD buňky u postnatálních jedinců.** Vypreparovaná dolní čelist postnatálního jedince. Oblast moláru M1 a jeho okolí. U postnatálního jedince z křížení *Shh*Cre x *R26R-Confetti* (stáří 5 týdnů) jsme mohli pozorovat *Shh* exprimující buňky.

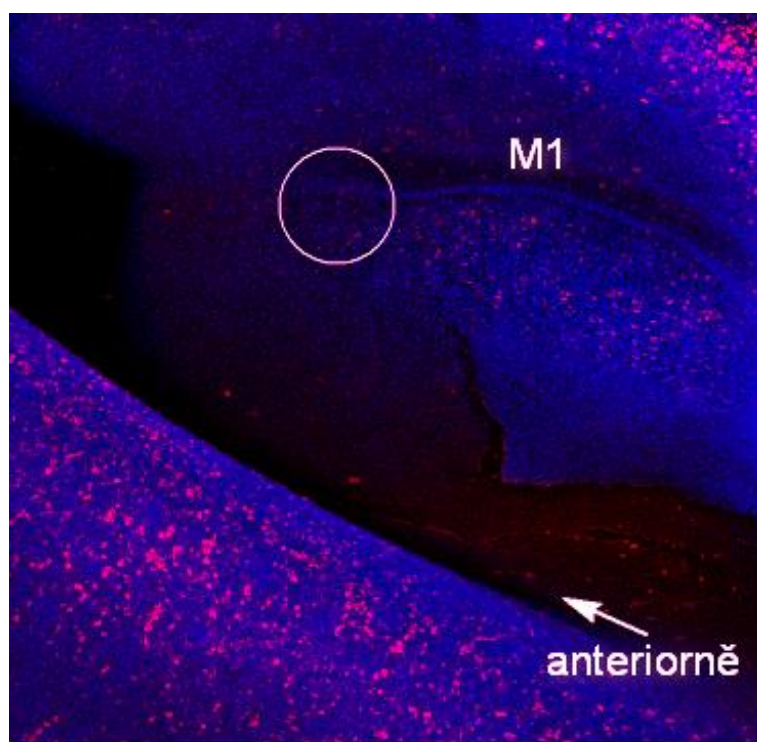
Vlevo: procházející světlo, vpravo: snímek z konfokálního mikroskopu, RTSCD buňky se vyskytují anteriorně před M1 (označeno šipkou) a exprimují CFP (modře), GFP (zeleně), RFP (červeně) a YFP (žlutě), detail viz obr. 19.



**Obr. 19. RTSCD buňky u postnatálních jedinců.** Vypreparovaná dolní čelist postnatálního jedince (stáří 5 týdnů) z křížení *Shh*Cre x *R26R-Confetti*. Detail oblasti signálního centra MS, barevnými šipkami označeny buňky exprimující CFP (modře) a GFP (zeleně), ostatní buňky exprimují RFP (červeně) a YFP (žlutě).

### 6.3 V oblasti RTSCD buněk nedochází k proliferaci

Pro zjištění dalších vlastností této specifické buněčné populace bylo provedeno whole mount značení pomocí inkorporace BrdU v celé dolní čelisti embrya (14,5 ED). Tkáň byla následně pozorovaná konfokálním mikroskopem. V oblasti před prvním molárem byla zaznamenána pouze nepatrná proliferace buněk, viz obr. 20. V oblasti vyvíjejícího se zárodku moláru M1 není zaznamenána proliferace, jelikož snímání konfokálního mikroskopu je omezeno pouze na určitou hloubku pozorovaného vzorku (primordium M1 se vyvíjí hlouběji než rudiment MS).

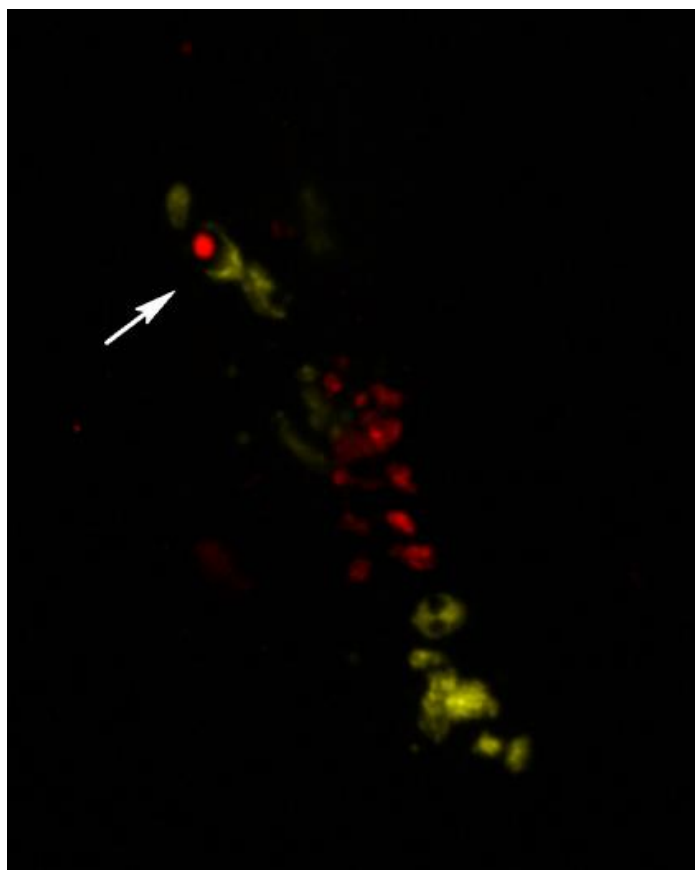


**Obr. 20. Whole mount značení pomocí inkorporace BrdU.** Oblast zubního zárodku M1 u dolní čelisti embrya (14,5 ED), v kroužku oblast RTSCD buněk, červeně značeny proliferující buňky, modře okolní tkáň (značeno DAPI), v dolní části obrázku se nachází část jazyka.

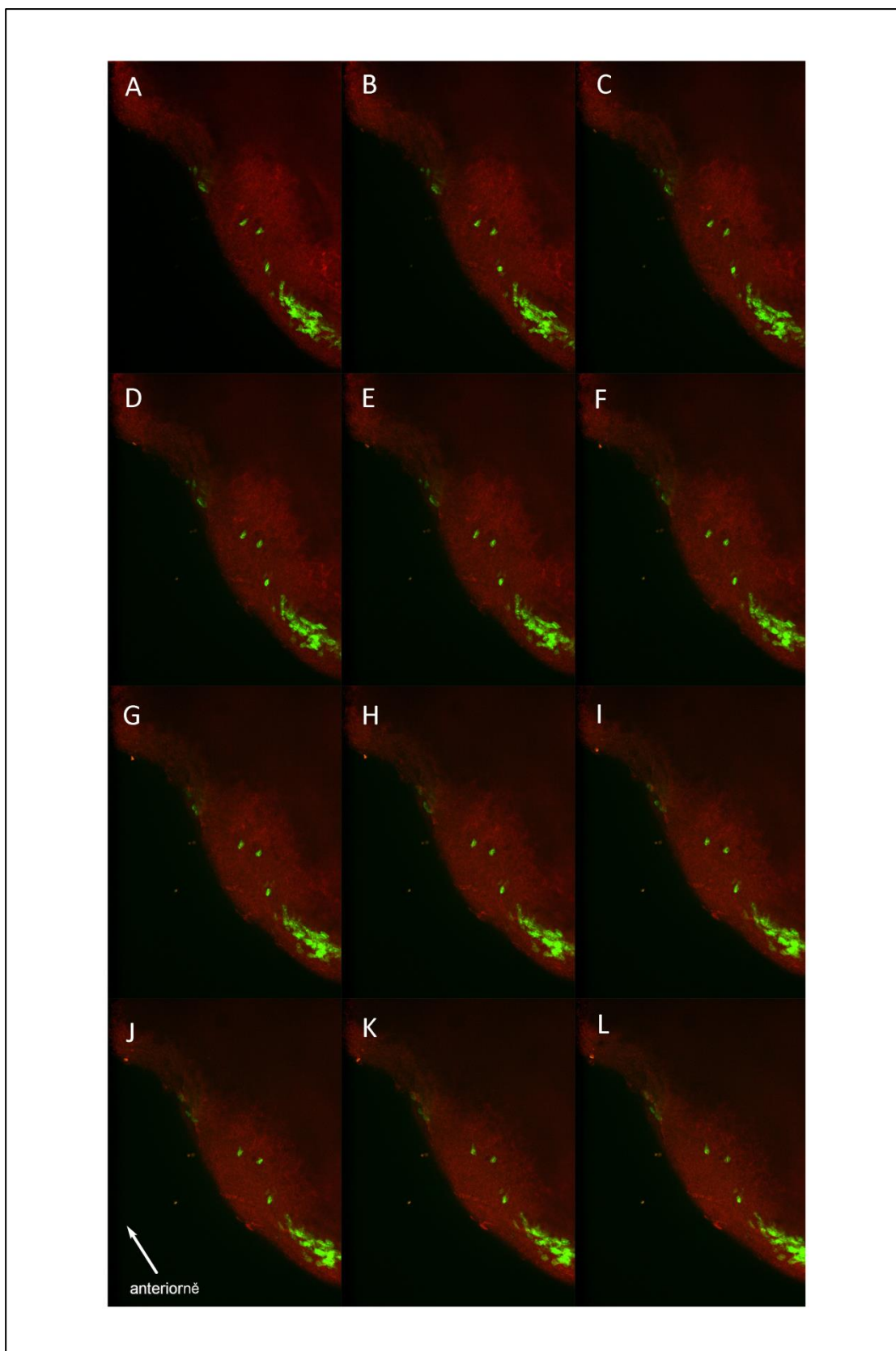


## 6.4 Časosběrná mikroskopie

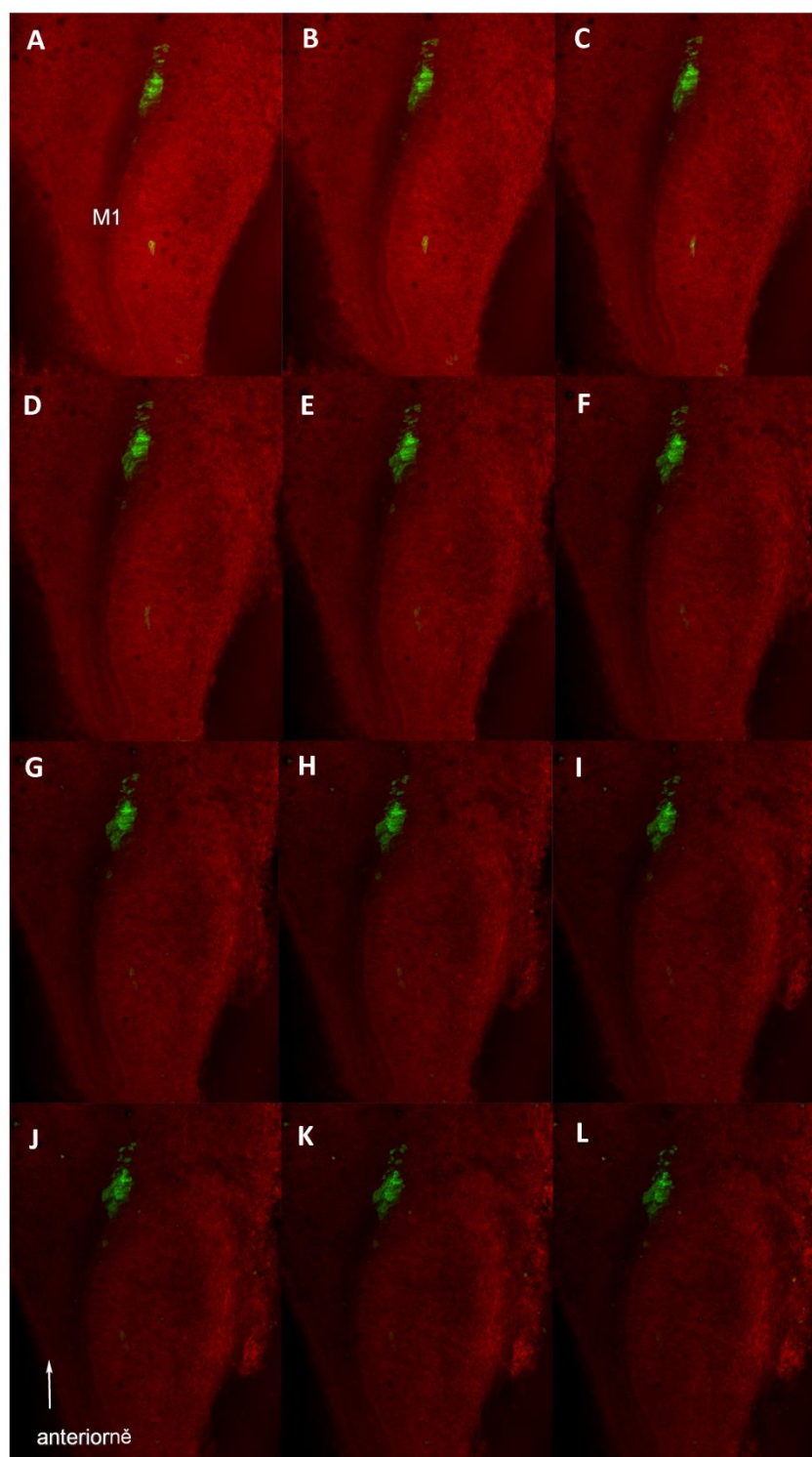
K časosběrné mikroskopii živé tkáně bylo využito křížení *ShhCreER* x mT/mG a *ShhCreER* x R26R-*Confetti*. Tato křížení umožnila pozorování značené populace RTSCD buněk *in vitro*. V případě křížení *ShhCreER* x mT/mG probíhalo snímání sériově (z ED 12,5 na ED 13,5, z ED 13,5 na ED 14,5 a z ED 14,5 na ED 15,5) pomocí konfokálního mikroskopu s rotujícím diskem (viz obr. 22., 23., 24.). U křížení *ShhCreER* x R26R-*Confetti* probíhalo snímání z ED 14,5 na ED 15,5 (viz obr. 25.). Ze sekvenčního záznamu mikroskopu byla složena videa, ze kterých je zřejmé, že populace jako celek není aktivní v pohybu, ale je pouze pasivně posouvána rostoucí tkání moláru M1. Ze záznamu *ShhCreER* x R26R-*Confetti* myši je však patrné, že uvnitř této populace jsou buňky aktivní a interagují se svým okolím (viz detail obr. 21.). Jednotlivá videa jsou součástí přílohy diplomové práce.



**Obr. 21.** Snímek z časosběrné mikroskopie značených RTSCD buněk. Embryo z křížení *ShhCreER* x R26R-*Confetti* na ED13,5 – 14,5. Uvnitř této populace jsou buňky poměrně aktivní a interagují se svým okolím (viz např. šipka, další snímky z videa viz obr. 25.)

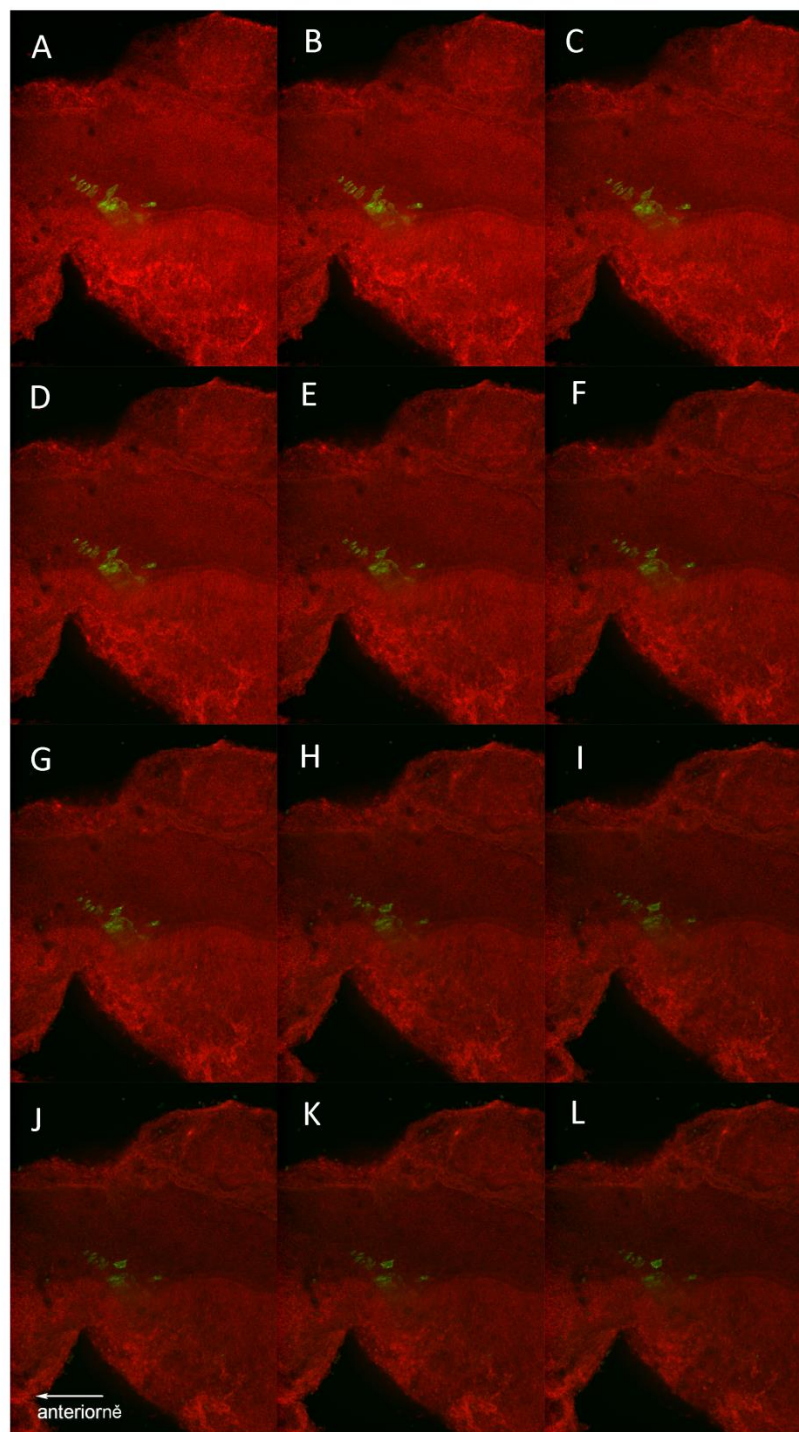


**Obr. 22.** Série fotografií z časosběrné konfokální mikroskopie značených RTSCD buněk I. Zobrazené snímky vždy po hodině (embryo z křížení *Shh*CreER x mT/mG na ED 12,5 – 13,5) Značená populace buněk (zeleně) je pasivně posouvána rostoucím zárodkem zubu M1 (celé video viz příloha diplomové práce).

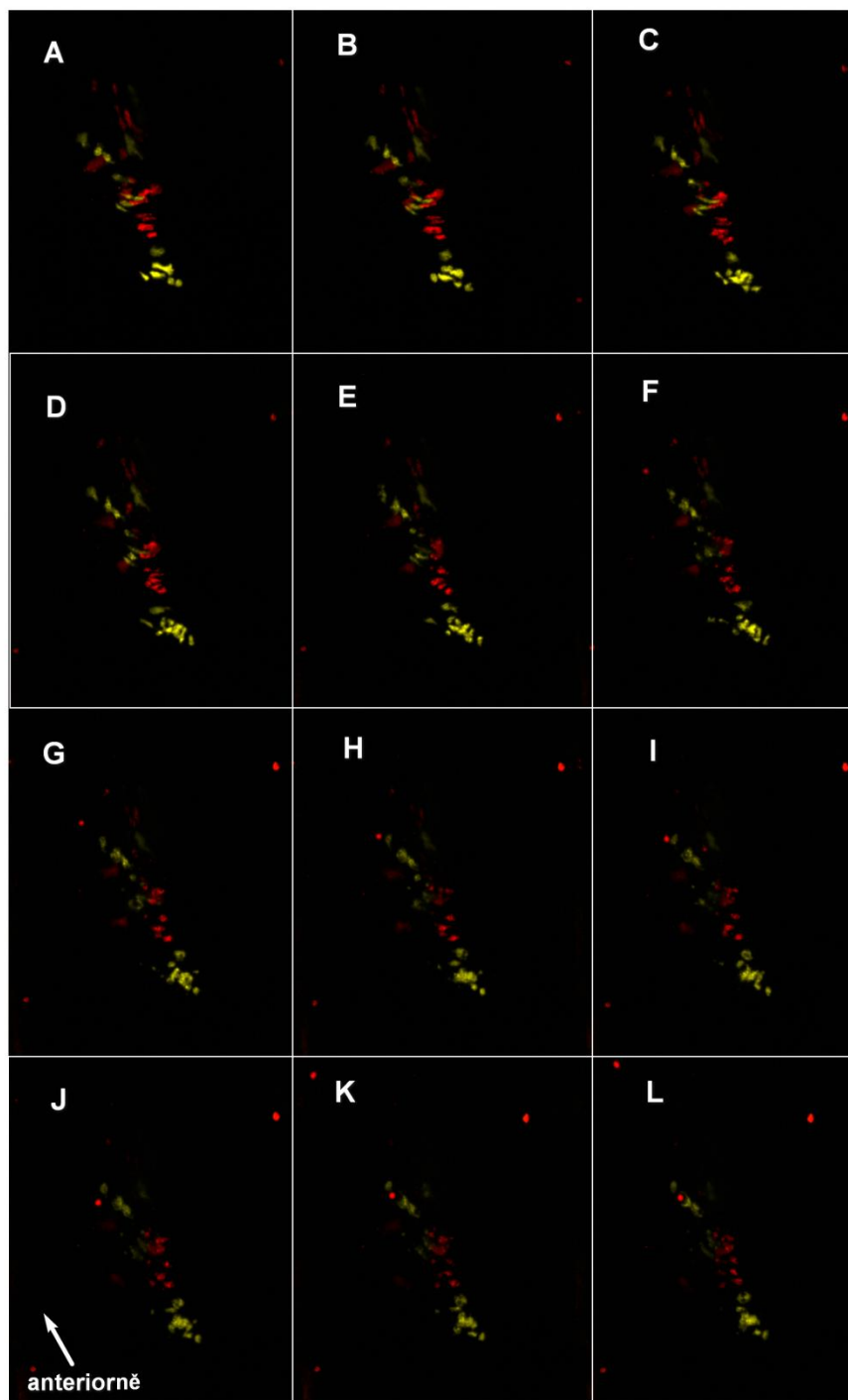


**Obr. 23. Série fotografií z časosběrné konfokální mikroskopie značených RTSCD buněk II.** Zobrazené snímky vždy po hodině (embryo z křížení *Shh*CreER x mT/mG na ED 13,5 – 14,5). Značená populace buněk (zeleně) je pasivně posouvána (anteriorně) rostoucím zárodkem zubu M1 (celé video viz příloha diplomové práce).





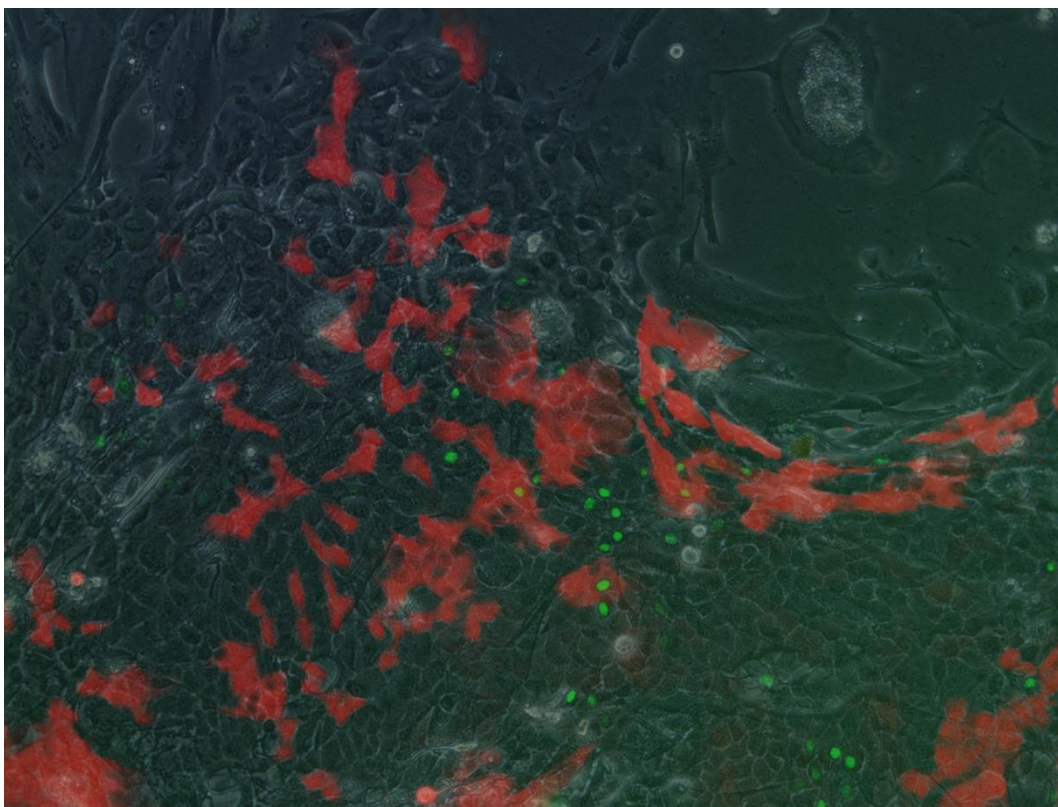
**Obr. 24. Série fotografií z časosběrné konfokální mikroskopie značených RTSCD buněk III.** Zobrazené snímky vždy po hodině (embryo z křížení *Shh*CreER x mT/mG na ED 14,5 – 15,5). Značená populace buněk (zeleně) je pasivně posouvána rostoucím zárodkem zubu M1 (celé video viz příloha diplomové práce).



**Obr. 25.** Série fotografií z časosběrné konfokální mikroskopie značených RTSCD buněk IV. Zobrazené snímky vždy po hodině (embryo z křížení *ShhCreER* x *R26R-confetti* ED 13,5 – 14,5). Uvnitř této populace jsou buňky poměrně aktivní a interagují se svým okolím (viz detail, obr. 21., celé video viz příloha diplomové práce).

## 6.5 Kulivace *in vitro*

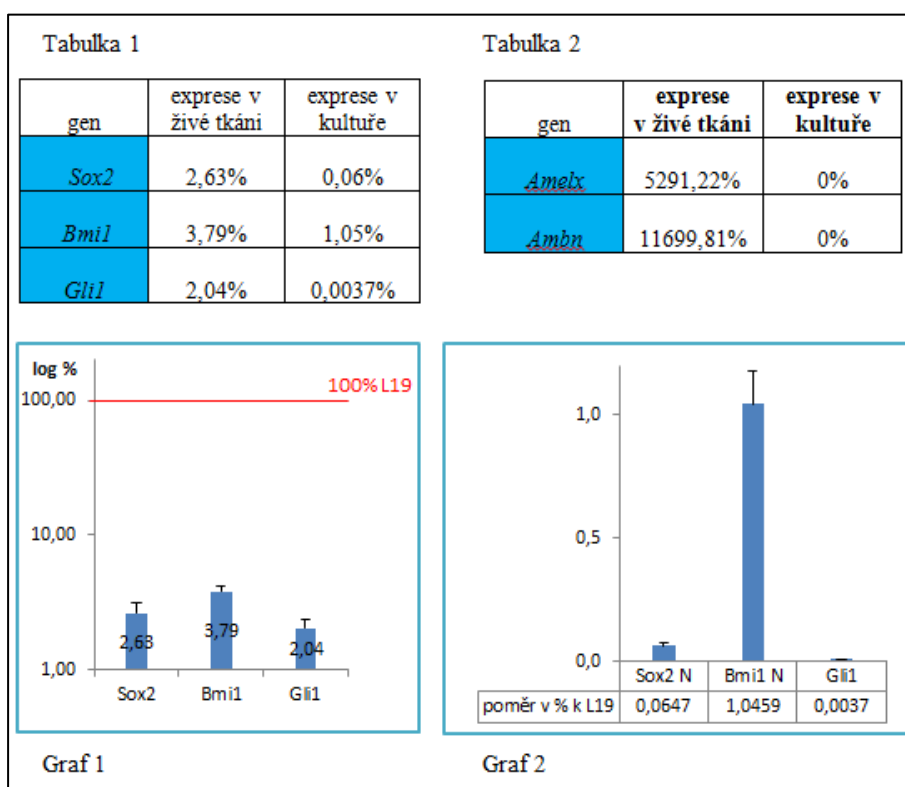
Potomci z křížení *ShhCre* x *R26R-Confetti* (stáří 1 a 5 týdnů) byli využiti také ke kultivaci *in vitro*. Z oblasti před prvním molárem byla izolovaná fluorescenční tkáň a dále přenesena do kultivačních misek s MEF feederem. Kultivace probíhala při teplotě 37 °C v 5% CO<sub>2</sub> po dobu jednoho týdne. Izolované buňky v kultuře jsme mohli mikroskopicky pozorovat díky expresi fluorescenčních proteinů (viz obr. 26). Odebrané buňky z jedince (5 týdnů) se podařilo úspěšně kultivovat po celou dobu experimentu. Buňky dále bez problémů rostly a dělily se. Buňky z této kultury byly dále analyzovány pomocí Real-time qRT PCR. Izolované buňky z druhého jedince (stáří 1 týden) se nepodařilo dále kultivovat (zřejmě z důvodů kontaminace kultury).



**Obr. 26. Kultivace RTSCD buněk *in vitro*.** Fotografie z invertovaného fluorescenčního mikroskopu. Izolované RTSCD buňky potomka z křížení *ShhCre* x *R26R-Confetti* (5 týdnů). Na obrázku jsou vidět buňky exprimující GFP (v jádrech buněk, viditelné zeleně) i RFP (v cytoplazmě, viditelné červeně) po 7 dnech kultivace rostoucí na vrstvě MEF buněk.

## 6.6 Real-time qRT PCR

Z fluorescenčně značené RTSCD buňky z tkáně postnatálního jedince (1 týden) a kultury (oboje z křížení *ShhCre* x *R26R-Confetti*) byla izolovaná RNA pomocí RNeasy mini kitu (Qiagen, Hilden, Německo). Pomocí nanodropu byla určena koncentrace RNA – 2,8 a 12,5 µg/1µl. Výsledná RNA pak byla pomocí reverzní transkripce přepsána do cDNA a dále analyzována pomocí Real-time qPCR reakce. Pomocí komparativní Ct metody pak bylo vypočítáno množství exprimované DNA v původní tkáni. U obou vzorků cDNA byla testována přítomnost markerů tkáňových kmenových buněk – *Sox2*, *Bmi1*, *Gli1* a množství vyjádřeno jako poměr v % ku housekeeping genu *L19*. V buněčné kultuře však bylo množství těchto markerů znatelně menší, viz obr. 27. Dále byly testovány také geny pro amelogenin (*Amelx*) a ameloblastin (*Ambn*). Z cDNA živé tkáně byla změřena velmi vysoká exprese obou těchto genů. V kultuře byl naopak výsledek negativní, viz obr. 27.



**Obr. 27. Hodnoty z Real-time qPCR reakce a jejich grafické vyjádření v porovnání s house keeping genem *L19* (v %).**

Tabulka 1. naměřené hodnoty markerů kmenových buněk z živé tkáně postnatálního jedince a z kultury *in vitro*. Tabulka 2. naměřené hodnoty exprese genů pro amelogenin a ameloblastin z živé tkáně postnatálního jedince a z kultury *in vitro*. Graf 1. vyjádření exprese markerů kmenových buněk z živé tkáně postnatálního jedince. Graf 2. vyjádření exprese markerů kmenových buněk z *in vitro* kultury.

## 7 Diskuze

### 7.1 Rudimentární primordia R2 a MS

Na základě morfologických dat bylo popsáno, že v diastemě dolní čelisti embrya myši se vyvíjejí rudimentární primordia R2 a MS, která jsou zřejmě vývojovým pozůstatkem premolárů. Začínají se normálně vyvíjet, ale dále podléhají regresi (Viriot et al., 2000; 2002; Peterková et al., 2000). Následně byla na ED 13 popsána také exprese genu *Shh* anteriorně před primordiem prvního moláru (Kangas et al. 2004; Mustonen et al. 2004). Později byla tato data znovu testována, a ověřena také na molekulární úrovni. Bylo prokázáno, že primordia MS a R2 mají svá vlastní *Shh* signální centra, a exprimují také další geny stejně jako pEK primordia prvního moláru (Peterková et al., 2009; Prochazka et al., 2010).

Studium vývoje a osudu rudimentárních zubních primordií přináší důležité informace nejen o regulaci vývoje zubů, ale také o mechanismech jeho potlačení během ontogeneze, které se mohly uplatňovat i při redukci zubního počtu během fylogeneze. V mém diplomovém projektu jsme ke studiu mechanismu vzniku a dalšího osudu buněk rudimentárních primordií vybrali jako modelový systém buněčnou populaci signálního centra primordia MS. Toto primordium má z počátku výrazný odontogenní potenciál, neboť se začíná vyvíjet stejným způsobem jako primordium funkčního zubu, např. M1. Dle morfologických studií však MS rudiment záhy zastavuje svůj vývoj za účasti apoptózy a transformuje se v epitelový val před prvním molárem (Viriot et al., 2000; 2002; Peterková et al., 2000). Předpokládá se, že během dalšího vývoje se může epitelový val sekundárně inkorporovat do rostoucího prvního moláru (M1) (Peterková et al., 2005).

Je tedy otázkou, proč se rudiment, který se výrazně nepodílí na tvorbě funkčního zubu, embryonálně vyvíjí a perzistuje v evoluci myši více než 50 miliónů let. Rudimentární struktury s odontogenním potenciálem se vyskytují nejen u myši (přehled viz Peterková et al., 2002), ale také u člověka (Hovorakova et al., 2005, 2007). Díky svému vývojovému potenciálu na časném stádiu mohou rudimentární zubní primordia sloužit také jako modelový systém pro ovládanou zubní regeneraci na myších a v budoucnu i u člověka (Peterková et al., 2006, 2009).

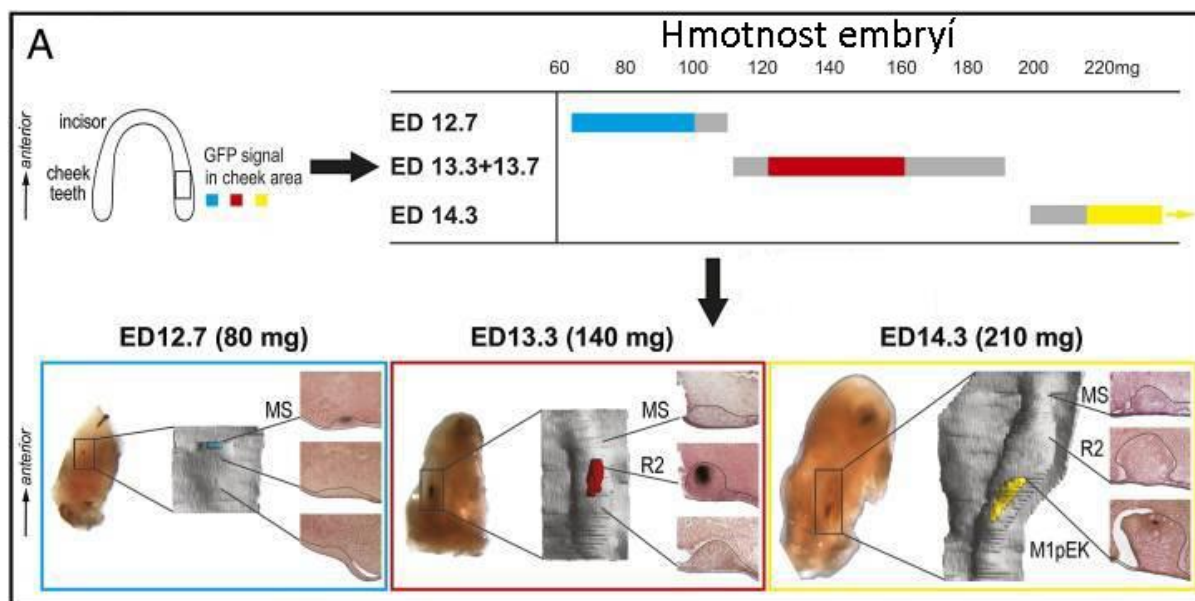


## 7.2 Exprese genu *Shh*

Exprese genu *Shh* se v současné době používá jako marker signálního centra vyvíjejících se zubů u savců i ryb (Thesleff et al., 2001; Fraser et al., 2004). U zubních primordií MS, R2 a M1 byla popsána na ED 12,7; 13,3 a 14,3 (Prochazka et al., 2010, viz obr. 29). Do té doby byla tato primordia a jejich signální centra považována za vyvíjející se primordium zubu M1 (např. Vaahtokari et al., 1996; Jernvall a Thesleff, 2000).

Signální centrum primordia MS tedy exprimuje gen *Shh* na ED 12,7 (Prochazka et al., 2010). Populaci *Shh* exprimující buněk MS rudimentu (RTSCD buňky) jsme označili pomocí inducibilní Cre-lox technologie (aplikace tamoxifenu na 11,7 ED, princip viz kapitola 5. Materiál a metody). Sledovali jsme, zdali tyto značené buňky dále přetrvávají v epitelu. Obdobný postup byl popsán již autory v publikaci Ahn et al., (2010).

Nejdříve jsme tedy lokalizovali umístění této populace buněk prenatalně, a poté také u postnatálních jedinců. V obou případech se značená populace buněk vyskytovala v oblasti anteriorně před prvním molárem.



**Obr. 28. Schéma postupného vývoje *Shh* signálních center v tvářové oblasti dolní čelisti.** Nahoře: exprese *Shh* je typická v určitou dobu a při určité hmotnosti embrya. Exprese genu *Shh* v tvářové oblasti je u zubních primordií MS, R2 a M1 na ED 12,7; 13,3 + 13,7 a 14,3. Dole: *Shh in situ* hybridizace a 3D rekonstrukce. Z frontálních řezů mandibuly byly udělány 3D rekonstrukce. *Shh* signální centra odpovídají morfologickým strukturám MS, R2 a M1 (převzato z Prochazka et al., 2010).

U potomka z *ShhCre* x *R26R-Confetti* křížení jsme také zjistili, že tyto buňky nejsou klonálního původu. To tedy dokazuje společnou finální lokalizaci RTSCD buněk. V opačném případě by se mohlo jednat o dceřinou populaci jediné *Shh* pozitivní buňky. Obdobným způsobem sledovali také Snippert et al. (2010) klonální původ u *Lgr5* kmenových buněk ve střevním epitelu.

### 7.3 Proliferace versus regrese

Dalším z cílů bylo zjistit, zdali tato populace vykazuje proliferační aktivitu. K tomu jsme použili standardní metodiku whole-mount značení pomocí BrdU. V oblasti *Shh* pozitivní populace, kterou jsme před tím lokalizovali, je zaznamenána pouze nepatrná proliferační aktivita. Zvláště porovnáme-li tuto oblast s tkání vyvíjecího se jazyka (viz obr. 20). V oblasti vyvíjecího se zárodku moláru M1 není zaznamenána proliferace, jelikož snímání konfokálního mikroskopu je omezeno pouze na určitou hloubku pozorovaného vzorku. Tento výsledek tak koreluje s tím, že oblast rudimentárního primordia MS v dalším vývoji diastemy podléhá regresi spojenou s apoptózou (Viriot et al., 2000, Peterková et al., 2003; 2002). Na druhou stranu není zřejmě bez důvodu (více viz níže), že minimálně část RTSCD buněk, ač dále neproliferuje a zřejmě část z nich zaniká apoptózou, podle našich výsledků dále přetrvává na stejném místě i u postnatálních jedinců.

### 7.4 Vlastnosti buněčné populace RTSCD buněk

Dále jsme charakterizovali vlastnosti této populace a to jak přímo, tak ve vztahu k vyvíjecímu se primordiu zubu M1. K tomu jsme nejprve využili konfokální časosběrnou mikroskopii. Ze sériového snímání konfokálního mikroskopu jsme složili videa, z kterých je patrné, že tato populace zůstává prakticky nezměněna i během dalšího růstu a je pouze pasivně posouvána narůstající tkání primordia prvního moláru, viz obr. 22-25. Díky detailnějšímu pozorování v případě křížení *ShhCreER* x *R26R-Confetti* myši jsme ovšem zjistili, že v rámci této značené populace jsou buňky poměrně aktivní a interagují se svým okolím (viz obr. 21. a video 4. v příloze diplomové práce).

Pomocí Real-time qRT PCR jsme zjistili, že v izolovaném buněčném materiálu (*in vivo*) se exprimují markery kmenových buněk (*Gli1*, *Bmi1*, *Sox2*). Tyto markery jsou běžně

využívané markery pluripotentních tkáňových kmenových buněk (např. Kamachi et al., 2000; Liu et al., 2006). Dalšími testovanými markery byly geny pro amelogenin (*Amely*) a ameloblastin (*Amelx*). Z tkáně postnatálního jedince byla změřena velmi vysoká exprese obou těchto genů. Je tedy potencionální možnost, že jsme izolovali přímo buněčnou populaci, která syntetizuje ameloblastin/amelogenin a zároveň exprimuje markery tkáňových kmenových buněk.

Tyto značené buňky jsme také izolovali a kultivovali *in vitro* na podpůrné vrstvě MEF buněk. Izolované buňky z jedince (5 týdnů) v kultuře rostly a dělily se po celou dobu experimentu. Buňky z této kultury byly poté opět analyzovány pomocí Real-time qRT PCR. I v kultuře se dále exprimovaly stejné markery kmenových buněk jako z tkáně *in vivo* a udržely si tedy i nadále svůj nediferencovaný stav tkáňových kmenových buněk. Oproti tomu jsme zjistili, že se v kultuře *in vitro* dále vůbec neexprimují geny pro proteiny ameloblastin/amelogenin. Při izolaci buněk se ovšem prakticky nedá zabránit tomu, že jsme spolu s fluorescenčně značenými buňkami vypreparovali také okolní buňky. Je tedy možné, že tyto buňky jsou ty, které podporují buňky syntetizující ameloblastin/amelogenin, což může být jedním z důvodů, proč jsou stále přítomny i u dospělců. Další otázkou je tedy proč tyto buňky exprimují markery kmenových buněk a proč se právě zde exprimují také geny pro proteiny matrix skloviny. Je možné, že jsme tímto objevili nový zdroj tkáňových kmenových buněk z epitelové tkáně či mechanismus jejich regulace pomocí strukturních proteinů amelogeninu/ameloblastinu, které mají své využití i v praxi, a to v léčbě paradontózy pomocí Emdogainu.



## 8 Závěry

Pomocí různých metodických přístupů jsme testovali osud (v praxi se užívá spíše výraz lineage tracing) značené populace signální domény rudimentárního primordia MS v epitelu. Jako marker signální aktivity jsme použili expresi genu *Shh*. Ke sledování této buněčné populace jsme křížili kmeny *ShhCre* a *ShhCreER* v kombinaci s příslušnými reportérovými geny. Potvrdili jsme alternativní hypotézu, tedy že část buněčné populace *Shh* signálního centra primordia MS dále přetrvává během prenatálního vývoje i u postnatálních jedinců a odpověděli jsme na související otázky:

1. *Jaký je další osud buněk, které exprimují gen Shh v době signální aktivity centra MS? Přetrvává tato populace buněk dále v epitelu?*

Tato populace minimálně částečně přetrvává během dalšího prenatálního období až do dospělosti jedince.

2. *Jaké je cílové umístění těchto buněk v adultní tkáni?*

Značené buňky se v adultní tkáni nacházejí anteriorně před prvním molárem (M1).

3. *Vyazuje tato populace buněk proliferační aktivitu?*

V oblasti *Shh* signálního centra rudimentárního primordia MS byla zaznamenána jen nepatrná proliferace.

4. *Mají tyto buňky zachovaný zubní vývojový program v podobě exprese markerů tkáňových kmenových buněk případně exprese genů pro strukturální proteiny?*

Izolovaná buněčná populace exprimuje markery tkáňových kmenových buněk (*Gli1*, *Bmi1*, *Sox2*) a zároveň velmi výrazně exprimuje geny pro strukturální proteiny: ameloblastin a amelogenin.

5. *Lze tyto buňky izolovat a dále kultivovat a liší se potom nějak od buněk in vivo?*

Fluorescenčně značené buňky *Shh* signálního centra primordia MS lze dále izolovat a kultivovat *in vitro*. Buňky v kultuře rostou, dělí se a exprimují také stejné markery kmenových buněk jako v tkáni *in vivo*, a udržují si tak svůj nediferencovaný potenciál tkáňových kmenových buněk. Exprese amelogeninu/ameloblastinu ovšem v kultuře nebyla zachována.

V průběhu mého diplomového projektu jsem se seznámila se způsobem experimentální práce v laboratoři i s chovem laboratorních zvířat. Měla jsem možnost pracovat i na zahraničním pracovišti (laboratoř O. Kleina, Kalifornská univerzita San Francisco), kde bylo k dispozici špičkové vybavení jako je například konfokální mikroskop s rotujícím diskem. Také jsem mohla využít tamní bohatý chov transgenních myší, zejména mT/mG a R26R-Confetti myší kmeny.

V průběhu mého projektu jsme se ovšem potýkali také s komplikacemi, jako byla infekce viru MHV a nutná rederivace celého chovu myší. To výrazně narušilo všechny naše probíhající experimenty, protože křížení transgenních myší je časově i finančně náročný proces. Stejně tak nebylo vždy jednoduché získat z křížení myší vhodná embrya k experimentu, neboť po rekombinaci získáme vždy jen určitou procentuální část fluorescenčně pozitivních potomků (někdy také žádné). Z těchto důvodů by bylo vhodné ve studii dále pokračovat, např. v rámci navazujícího Ph.D. studia. Chtěli bychom například provést delší časosběrnou mikroskopii v jednom časovém úseku. Také by bylo vhodné sledovat osud RTSCD buněk na více různých vývojových stádiích prenatálních i postnatálních jedinců. Dále bychom chtěli analyzovat tuto buněčnou populaci na přítomnost dalších markerů kmenových buněk (např. také s použitím *Lgr5CreER* transgenního kmenu) a zaměřit se na možnost izolace nového zdroje epitelových kmenových buněk.

V mém doktorském studiu bych se chtěla také více zaměřit na význam exprese amelogeninu a ameloblastinu v této buněčné populaci. Vhodnou metodou pro studium vztahů buněčných populací může být tvorba miniaturního orgánu neboli organoidu, který stejně jako zuby obsahuje dvě interagující vrstvy buněk – ektomezenchymální a epitelové buňky, a napodobuje tím přirozenou mezibuněčnou interakci. Tyto sférické útvary můžeme kultivovat *in vitro* a měřit expresi, aktivitu a vztahy různých genů, podobně jako to bylo použito u kultur organoidů střevní tkáně (Sato et al., 2009; Gracz et al., 2010; Spence et al., 2011). Pro analýzu a oddělení populace *Shh* exprimujících buněk by bylo vhodné použít průtokovou cytometrii a FACS. Mohli bychom pak přesně izolovat a definovat vlastnosti těchto buněk v adultní tkáni a odhalit tak jejich funkci v epitelu. Případně můžeme získat také data o další interagující populaci buněk z této oblasti. Naším cílem je tak více objasnit a zobecnit význam rudimentární struktur s odontogením potenciálem a podobných struktur v celém organismu.

## 9 Seznam použité literatury

- Aberg, T., Wozney, J., a Thesleff, I. (1997). Expression patterns of bone morphogenetic proteins (Bmps) in the developing mouse tooth suggest roles in morphogenesis and cell differentiation. *Dev. Dyn.* 210, 383–396.
- Ahn, Y., Sanderson, B.W., Klein, O.D., a Krumlauf, R. (2010). Inhibition of Wnt signaling by Wise (Sostdc1) and negative feedback from Shh controls tooth number and patterning. *Development* 137, 3221–3231.
- Ahrens H (1913) Die Entwicklung der menschlichen Zahne. *Anat Hefte* 48:169–257.
- D' Aquino, R., Papaccio, G., Laino, G., a Graziano, A. (2008). Dental Pulp Stem Cells: A Promising Tool for Bone Regeneration. *Stem Cell Rev.* 4, 21–26.
- Bitgood, M.J., a McMahon, A.P. (1995). Hedgehog and Bmp Genes Are Coexpressed at Many Diverse Sites of Cell–Cell Interaction in the Mouse Embryo. *Developmental Biology* 172, 126–138.
- Bolk, L. (1921). Odontological Essays. *J. Anat.* 55, 138–186.
- Caterina, J.J., Skobe, Z., Shi, J., Ding, Y., Simmer, J.P., Birkedal-Hansen, H., a Bartlett, J.D. (2002). Enamelysin (Matrix Metalloproteinase 20)-deficient Mice Display an Amelogenesis Imperfecta Phenotype. *J. Biol. Chem.* 277, 49598–49604.
- Cicconetti, A., Sacchetti, B., Bartoli, A., Michienzi, S., Corsi, A., Funari, A., Robey, P.G., Bianco, P., a Riminucci, M. (2007). Human maxillary tuberosity and jaw periosteum as sources of osteoprogenitor cells for tissue engineering. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod* 104, 618.e1–12.
- Coin, R., Lesot, H., Vonesch, J.L., Haikel, Y., a Ruch, J.V. (1999). Aspects of cell proliferation kinetics of the inner dental epithelium during mouse molar and incisor morphogenesis: a reappraisal of the role of the enamel knot area. *Int. J. Dev. Biol.* 43, 261–267.
- Coin, R., Kieffer, S., Lesot, H., Vonesch, J.L., a Ruch, J.V. (2000). Inhibition of apoptosis in the primary enamel knot does not affect specific tooth crown morphogenesis in the mouse. *Int. J. Dev. Biol.* 44, 389–396.
- Dassule, H.R., a McMahon, A.P. (1998). Analysis of epithelial-mesenchymal interactions in the initial morphogenesis of the mammalian tooth. *Dev. Biol.* 202, 215–227.
- Dassule, H.R., Lewis, P., Bei, M., Maas, R., a McMahon, A.P. (2000). Sonic hedgehog regulates growth and morphogenesis of the tooth. *Development* 127, 4775–4785.
- Davideau, J.L., Demri, P., Hotton, D., Gu, T.T., MacDougall, M., Sharpe, P., Forest, N., a Berdal, A. (1999). Comparative study of MSX-2, DLX-5, and DLX-7 gene expression during early human tooth development. *Pediatr. Res.* 46, 650–656.

- Diekwisch, T.G.H. (2002). Pathways and fate of migratory cells during late tooth organogenesis. *Connect. Tissue Res.* *43*, 245–256.
- Douzery, E.J.P., Delsuc, F., Stanhope, M.J., a Huchon, D. (2003). Local molecular clocks in three nuclear genes: divergence times for rodents and other mammals and incompatibility among fossil calibrations. *J. Mol. Evol.* *57 Suppl 1*, S201–213.
- Estrela, C., Alencar, A.H.G. de, Kitten, G.T., Vencio, E.F., a Gava, E. (2011). Mesenchymal stem cells in the dental tissues: perspectives for tissue regeneration. *Braz Dent J* *22*, 91–98.
- Fitzgerald, L.R. (1973). Deciduous incisor teeth of the mouse (*Mus musculus*). *Arch. Oral Biol.* *18*, 381–389.
- Fleischmannova, J., Matalova, E., Tucker, A.S., a Sharpe, P.T. (2008). Mouse models of tooth abnormalities. *Eur. J. Oral Sci.* *116*, 1–10.
- Fong, C.D., a Hammarström, L. (2000). Expression of amelin and amelogenin in epithelial root sheath remnants of fully formed rat molars. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* *90*, 218–223.
- Fraser, G.J., Graham, A., a Smith, M.M. (2004). Conserved deployment of genes during odontogenesis across osteichthyans. *Proc. Biol. Sci.* *271*, 2311–2317.
- Freund P. (1892). Beiträge zur Entwicklungsgeschichte der Zahnanlagen bei Nagethieren. *Arch Mikrosk Anat* *39*:525–555.
- Van Genderen, C., Okamura, R.M., Fariñas, I., Quo, R.G., Parslow, T.G., Bruhn, L., a Grosschedl, R. (1994). Development of several organs that require inductive epithelial-mesenchymal interactions is impaired in LEF-1-deficient mice. *Genes Dev.* *8*, 2691–2703.
- Gracz, A.D., Ramalingam, S., a Magness, S.T. (2010). Sox9 expression marks a subset of CD24-expressing small intestine epithelial stem cells that form organoids in vitro. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *298*, G590–600.
- Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P.G., a Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *97*, 13625–13630.
- Gruenbaum-Cohen, Y., Tucker, A.S., Haze, A., Shilo, D., Taylor, A.L., Shay, B., Sharpe, P.T., Mitsiadis, T.A., Ornoy, A., Blumenfeld, A., et al. (2009). Amelogenin in cranio-facial development: the tooth as a model to study the role of amelogenin during embryogenesis. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* *312B*, 445–457.
- Grüneberg, H. (1966). The molars of the tabby mouse, and a test of the “single-active X-chromosome” hypothesis. *J. Embryol. Exp. Morphol.* *15*, 223–244.
- Hall, B.K. (2003). Descent with modification: the unity underlying homology and homoplasy as seen through an analysis of development and evolution. *Biological Reviews* *78*, 409–433.

- Harada, H., Toyono, T., Toyoshima, K., Yamasaki, M., Itoh, N., Kato, S., Sekine, K., a Ohuchi, H. (2002). FGF10 maintains stem cell compartment in developing mouse incisors. *Development* 129, 1533–1541.
- Hardcastle, Z., Mo, R., Hui, C.C., a Sharpe, P.T. (1998). The Shh signalling pathway in tooth development: defects in Gli2 and Gli3 mutants. *Development* 125, 2803–2811.
- Hart, P.S., Hart, T.C., Michalec, M.D., Ryu, O.H., Simmons, D., Hong, S., a Wright, J.T. (2004). Mutation in kallikrein 4 causes autosomal recessive hypomaturation amelogenesis imperfecta. *J. Med. Genet.* 41, 545–549.
- Haze, A., Taylor, A.L., Blumenfeld, A., Rosenfeld, E., Leiser, Y., Dafni, L., Shay, B., Gruenbaum-Cohen, Y., Fermon, E., Haegewald, S., et al. (2007). Amelogenin expression in long bone and cartilage cells and in bone marrow progenitor cells. *Anat Rec (Hoboken)* 290, 455–460.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., and Williams, P.M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6, 986–994.
- Heijl, L., Heden, G., Svärðström, G., a Ostgren, A. (1997). Enamel matrix derivative (EMDOGAIN) in the treatment of intrabony periodontal defects. *J. Clin. Periodontol.* 24, 705–714.
- Hinrichsen, K. (1959). Morphological studies on the topogenesis of the mandibular gnawing tooth of the mouse. *Anat Anz.* 107, 55–74.
- Horký, D., Nováková K., Morfologie orofaciálního systému pro studenty zubního lékařství, 1. vydání, Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2005, ISBN 80-244-1062-1
- Hovorakova, M., Lesot, H., Peterka, M., a Peterkova, R. (2005). The developmental relationship between the deciduous dentition and the oral vestibule in human embryos. *Anat. Embryol.* 209, 303–313.
- Hovorakova, M., Lesot, H., Vonesch, J.-L., Peterka, M., a Peterkova, R. (2007). Early development of the lower deciduous dentition and oral vestibule in human embryos. *Eur. J. Oral Sci.* 115, 280–287.
- Hovorakova, M., Prochazka, J., Lesot, H., Smrckova, L., Churava, S., Boran, T., Kozmik, Z., Klein, O., Peterkova, R., a Peterka, M. (2011). Shh expression in a rudimentary tooth offers new insights into development of the mouse incisor. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 316, 347–358.
- Hovorakova, M., Smrckova, L., Lesot, H., Lochovska, K., Peterka, M., a Peterkova, R. (2013). Sequential Shh expression in the development of the mouse upper functional incisor. *J. Exp. Zool. Mol. Dev. Evol.* 9999B: 1–10.

- Chardin, H., Septier, D., Lecolle, S., a Goldberg, M. (1989). Effect of tunicamycin on glycogen accumulation in the stratum intermedium and odontoblasts of rat incisor. *Cell Tissue Res.* 256, 519–527.
- Chen, Y., Bei, M., Woo, I., Satokata, I., a Maas, R. (1996). *Msx1* controls inductive signaling in mammalian tooth morphogenesis. *Development* 122, 3035–3044.
- Cho, S.-W., Lee, H.-A., Cai, J., Lee, M.-J., Kim, J.-Y., Ohshima, H., a Jung, H.-S. (2007). The primary enamel knot determines the position of the first buccal cusp in developing mice molars. *Differentiation* 75, 441–451.
- Ibarretxe, G., Crende, O., Aurrekoetxea, M., García-Murga, V., Etxaniz, J., a Unda, F. (2012). Neural Crest Stem Cells from Dental Tissues: A New Hope for Dental and Neural Regeneration. *Stem Cells International* 2012, 1–12.
- Ikehara, S. (2002). Bone marrow transplantation: a new strategy for intractable diseases. *Drugs Today* 38, 103–111.
- Iseki, S., Araga, A., Ohuchi, H., Nohno, T., Yoshioka, H., Hayashi, F., a Noji, S. (1996). Sonic hedgehog is expressed in epithelial cells during development of whisker, hair, and tooth. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 218, 688–693.
- Jernvall, J., a Thesleff, I. (2000). Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mechanisms of Development* 92, 19–29.
- Jernvall, J., Kettunen, P., Karavanova, I., Martin, L.B., a Thesleff, I. (1994). Evidence for the role of the enamel knot as a control center in mammalian tooth cusp formation: non-dividing cells express growth stimulating *Fgf-4* gene. *Int. J. Dev. Biol.* 38, 463–469.
- Jernvall, J., Aberg, T., Kettunen, P., Keränen, S., a Thesleff, I. (1998). The life history of an embryonic signaling center: BMP-4 induces p21 and is associated with apoptosis in the mouse tooth enamel knot. *Development* 125, 161–169.
- Kamachi, Y., Uchikawa, M., a Kondoh, H. (2000). Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development. *Trends in Genetics* 16, 182–187.
- Kangas, A.T., Evans, A.R., Thesleff, I., a Jernvall, J. (2004). Nonindependence of mammalian dental characters. *Nature* 432, 211–214.
- Kassai, Y., Munne, P., Hotta, Y., Penttilä, E., Kavanagh, K., Ohbayashi, N., Takada, S., Thesleff, I., Jernvall, J., a Itoh, N. (2005). Regulation of mammalian tooth cusp patterning by ectodin. *Science* 309, 2067–2070.
- Kavanagh, K.D., Evans, A.R., a Jernvall, J. (2007). Predicting evolutionary patterns of mammalian teeth from development. *Nature* 449, 427–432.
- Kere, J., Srivastava, A.K., Montonen, O., Zonana, J., Thomas, N., Ferguson, B., Munoz, F., Morgan, D., Clarke, A., Baybayan, P., et al. (1996). X-linked anhidrotic (hypohidrotic) ectodermal dysplasia is caused by mutation in a novel transmembrane protein. *Nat. Genet.* 13, 409–416.

- Kettunen, P., a Thesleff, I. (1998). Expression and function of FGFs-4, -8, and -9 suggest functional redundancy and repetitive use as epithelial signals during tooth morphogenesis. *Dev. Dyn.* 211, 256–268.
- Király, M., Kádár, K., Horváthy, D.B., Nardai, P., Rácz, G.Z., Lacza, Z., Varga, G., a Gerber, G. (2011). Integration of neuronally predifferentiated human dental pulp stem cells into rat brain in vivo. *Neurochem. Int.* 59, 371–381.
- Klein, O.D., Minowada, G., Peterkova, R., Kangas, A., Yu, B.D., Lesot, H., Peterka, M., Jernvall, J., a Martin, G.R. (2006). Sprouty Genes Control Diastema Tooth Development via Bidirectional Antagonism of Epithelial-Mesenchymal FGF Signaling. *Developmental Cell* 11, 181–190.
- Kochhar, R., a Richardson, A. (1998). The chronology and sequence of eruption of human permanent teeth in Northern Ireland. *International Journal of Paediatric Dentistry* 8, 243–252.
- Krebsbach, P.H., Lee, S.K., Matsuki, Y., Kozak, C.A., Yamada, K.M., a Yamada, Y. (1996). Full-length Sequence, Localization, and Chromosomal Mapping of Ameloblastin A NOVEL TOOTH-SPECIFIC GENE. *J. Biol. Chem.* 271, 4431–4435.
- Lagerström, M., Dahl, N., Nakahori, Y., Nakagome, Y., Bäckman, B., Landegren, U., a Pettersson, U. (1991). A deletion in the amelogenin gene (AMG) causes X-linked amelogenesis imperfecta (AIH1). *Genomics* 10, 971–975.
- Lagronova-Churava, S., Spoutil, F., Vojtechova, S., Lesot, H., Peterka, M., Klein, O.D., a Peterkova, R. (2013). The Dynamics of Supernumerary Tooth Development Are Differentially Regulated by Sprouty Genes. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol* 320, 307–320.
- Lavelle, C.L., Ashton, E.H., a Flinn, R.M. (1970). Cusp pattern, tooth size and third molar agenesis in the human mandibular dentition. *Arch. Oral Biol.* 15, 227–237.
- Lesot, H., Vonesch, J.L., Peterka, M., Turecková, J., Peterková, R., a Ruch, J.V. (1996). Mouse molar morphogenesis revisited by three-dimensional reconstruction. II. Spatial distribution of mitoses and apoptosis in cap to bell staged first and second upper molar teeth. *Int. J. Dev. Biol.* 40, 1017–1031.
- Lesot, H., Peterková, R., Viriot, L., Vonesch, J.L., Turecková, J., Peterka, M., a Ruch, J.V. (1998). Early stages of tooth morphogenesis in mouse analyzed by 3D reconstructions. *Eur. J. Oral Sci.* 106 Suppl 1, 64–70.
- Linde, A. (1995). Dentin mineralization and the role of odontoblasts in calcium transport. *Connect. Tissue Res.* 33, 163–170.
- Liu, S., Dontu, G., Mantle, I.D., Patel, S., Ahn, N., Jackson, K.W., Suri, P., a Wicha, M.S. (2006). Hedgehog Signaling and Bmi-1 Regulate Self-renewal of Normal and Malignant Human Mammary Stem Cells. *Cancer Res* 66, 6063–6071.
- Matalova, E., Antonarakis, G.S., Sharpe, P.T., a Tucker, A.S. (2005). Cell lineage of primary and secondary enamel knots. *Dev. Dyn.* 233, 754–759.

- Meirelles, L. da S., a Nardi, N.B. (2009). Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Front. Biosci.* 14, 4281–4298.
- Mitsiadis, T.A., Angeli, I., James, C., Lendahl, U., a Sharpe, P.T. (2003). Role of Islet1 in the patterning of murine dentition. *Development* 130, 4451–4460.
- Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L.W., Robey, P.G., a Shi, S. (2003). SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 100, 5807–5812.
- Modino, S.A.C., a Sharpe, P.T. (2005). Tissue engineering of teeth using adult stem cells. *Arch. Oral Biol.* 50, 255–258.
- Moore, K.L. a Persaud T.V.N., (2002). Zrození člověka – Embryologie s klinickým zaměřením. (překlad 6. vydání). Praha: ISV nakladatelství, 564 pp. ISBN 80-85866-94-3.
- Morsczeck, C., Götz, W., Schierholz, J., Zeilhofer, F., Kühn, U., Möhl, C., Sippel, C., a Hoffmann, K.H. (2005). Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol.* 24, 155–165.
- Moss-Salentijn, L. (1978). Vestigial teeth in the rabbit, rat and mouse; their relationship to the problem of lacteal dentitions. *Development, function and evolution of teeth.* Academic Press, London, 13-29.
- Mundlos, S., Otto, F., Mundlos, C., Mulliken, J.B., Aylsworth, A.S., Albright, S., Lindhout, D., Cole, W.G., Henn, W., Knoll, J.H., et al. (1997). Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell* 89, 773–779.
- Mustonen, T., Ilmonen, M., Pummila, M., Kangas, A.T., Laurikkala, J., Jaatinen, R., Pispä, J., Gaide, O., Schneider, P., Thesleff, I., et al. (2004). Ectodysplasin A1 promotes placodal cell fate during early morphogenesis of ectodermal appendages. *Development* 131, 4907–4919.
- De Muynck, S., Schollen, E., Matthijs, G., Verdonck, A., Devriendt, K., a Carels, C. (2004). A novel MSX1 mutation in hypodontia. *Am. J. Med. Genet. A* 128A, 401–403.
- Muzumdar, M.D., Tasic, B., Miyamichi, K., Li, L., a Luo, L. (2007). A global double-fluorescent Cre reporter mouse. *Genesis* 45, 593–605.
- Nadiri, A., Kuchler-Bopp, S., Haikel, Y., a Lesot, H. (2004). Immunolocalization of BMP-2/-4, FGF-4, and WNT10b in the developing mouse first lower molar. *J. Histochem. Cytochem.* 52, 103–112.
- Nagy, A. (2000). Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 26, 99–109.
- Nakahori, Y., Takenaka, O., a Nakagome, Y. (1991). A human X-Y homologous region encodes “amelogenin.” *Genomics* 9, 264–269.



- Nakamura, H., a Ozawa, H. (1990). Lectin cytochemistry on the stratum intermedium and the papillary layer in the rat incisor enamel organ. *Arch. Histol. Cytol.* 53, 351–369.
- Nebgen, D.R., Inoue, H., Sabsay, B., Wei, K., Ho, C.S., a Veis, A. (1999). Identification of the chondrogenic-inducing activity from bovine dentin (bCIA) as a low-molecular-mass amelogenin polypeptide. *J. Dent. Res.* 78, 1484–1494.
- Nery, E.B., Kraus, B.S., a Croup, M. (1970). Timing and topography of early human tooth development. *Arch. Oral Biol.* 15, 1315–IN36.
- Neubüser, A., Peters, H., Balling, R., a Martin, G.R. (1997). Antagonistic Interactions between FGF and BMP Signaling Pathways: A Mechanism for Positioning the Sites of Tooth Formation. *Cell* 90, 247–255.
- Obara, N., a Lesot, H. (2007). Asymmetrical growth, differential cell proliferation, and dynamic cell rearrangement underlie epithelial morphogenesis in mouse molar development. *Cell Tissue Res.* 330, 461–473.
- Ohazama, A., Johnson, E.B., Ota, M.S., Choi, H.Y., Choi, H.J., Porntaveetus, T., Oommen, S., Itoh, N., Eto, K., Gritli-Linde, A., et al. (2008). Lrp4 modulates extracellular integration of cell signaling pathways in development. *PLoS ONE* 3, e4092.
- Ooe, T. (1956). On the development of position of the tooth germs in the human deciduous front teeth. *Okajimas Folia Anat Jpn* 28, 317–340.
- Peterka, M., Lesot, H., a Peterková, R. (2002). Body weight in mouse embryos specifies staging of tooth development. *Connect. Tissue Res.* 43, 186–190.
- Peterková, R. (1983). Dental lamina develops even within the mouse diastema. *J Craniofac Genet Dev Biol* 3:133–142.
- Peterková, R., Lesot, H., a Peterka, M. (2006). Phylogenetic memory of developing mammalian dentition. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 306, 234–250.
- Peterková, R., Churava, S., Lesot, H., Rothova, M., Prochazka, J., Peterka, M., a Klein, O.D. (2009). Revitalization of a diastemal tooth primordium in *Spry2* null mice results from increased proliferation and decreased apoptosis. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 312B, 292–308.
- Peterková, R., Peterka, M., a Ruch, J.V. (1993a). Morphometric analysis of potential maxillary diastemal dental anlagen in three strains of mice. *J. Craniofac. Genet. Dev. Biol.* 13, 213–222.
- Peterková, R., Peterka, M., Vonesch, J.L., a Ruch, J.V. (1993b). Multiple developmental origin of the upper incisor in mouse: histological and computer assisted 3-D-reconstruction studies. *Int. J. Dev. Biol.* 37, 581–588.
- Peterková R, Peterka M, Vonesch J.L., a Ruch J.V. (1995). Contribution of 3-D computer assisted reconstructions to the study of the initial steps of mouse odontogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 39:239–247.

- Peterková, R., Lesot, H., Vonesch, J.L., Peterka, M., a Ruch, J.V. (1996). Mouse molar morphogenesis revisited by three dimensional reconstruction. I. Analysis of initial stages of the first upper molar development revealed two transient buds. *Int. J. Dev. Biol.* *40*, 1009–1016.
- Peterková, R., Peterka, M., Viriot, L., a Lesot, H. (2000). Dentition development and budding morphogenesis. *J. Craniofac. Genet. Dev. Biol.* *20*, 158–172.
- Peterková, R., Peterka, M., Viriot, L., a Lesot, H. (2002). Development of the vestigial tooth primordia as part of mouse odontogenesis. *Connect. Tissue Res.* *43*, 120–128.
- Peterková, R., Peterka, M., a Lesot, H. (2003). The developing mouse dentition: a new tool for apoptosis study. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1010*, 453–466.
- Peterková, R., Lesot, H., Viriot, L., a Peterka, M. (2005). The supernumerary cheek tooth in tabby/EDA mice—a reminiscence of the premolar in mouse ancestors. *Arch. Oral Biol.* *50*, 219–225.
- Peters, H., a Balling, R. (1999). Teeth: where and how to make them. *Trends Genet.* *15*, 59–65.
- Peters, H., Neubüser, A., Kratochwil, K., a Balling, R. (1998). Pax9-deficient mice lack pharyngeal pouch derivatives and teeth and exhibit craniofacial and limb abnormalities. *Genes Dev.* *12*, 2735–2747.
- Peters, S., Strassburg, M. (1969). Zur Frage der ersten Dentition bei Kaninchen und Maus. *Z Säugetierk* *34*:91–97.
- Porntaveetus, T., Otsuka-Tanaka, Y., Basson, M.A., Moon, A.M., Sharpe, P.T., a Ohazama, A. (2011). Expression of fibroblast growth factors (Fgfs) in murine tooth development. *Journal of Anatomy* *218*, 534–543.
- Prochazka, J., Pantalacci, S., Churava, S., Rothova, M., Lambert, A., Lesot, H., Klein, O., Peterka, M., Laudet, V., a Peterkova, R. (2010). Patterning by heritage in mouse molar row development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *107*, 15497–15502.
- Radlanski, R.J. (1995). Morphogenesis of human tooth primordia: the importance of 3D computer-assisted reconstruction. *Int. J. Dev. Biol.* *39*, 249–256.
- Rajpar, M.H., Harley, K., Laing, C., Davies, R.M., a Dixon, M.J. (2001). Mutation of the gene encoding the enamel-specific protein, enamelin, causes autosomal-dominant amelogenesis imperfecta. *Hum. Mol. Genet.* *10*, 1673–1677.
- Renton, T., Hankins, M., Sproate, C., a McGurk, M. (2005). A randomised controlled clinical trial to compare the incidence of injury to the inferior alveolar nerve as a result of coronectomy and removal of mandibular third molars. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* *43*, 7–12.
- Rothová, M., Peterková, R., a Tucker, A.S. (2012). Fate map of the dental mesenchyme: Dynamic development of the dental papilla and follicle. *Dev. Biol.* *366*, 244–254.

- Salido, E.C., Yen, P.H., Koprivnikar, K., Yu, L.C., a Shapiro, L.J. (1992). The human enamel protein gene amelogenin is expressed from both the X and the Y chromosomes. *Am. J. Hum. Genet.* 50, 303–316.
- Sarkar, L., a Sharpe, P.T. (1999). Expression of Wnt signalling pathway genes during tooth development. *Mech. Dev.* 85, 197–200.
- Sato, T., Vries, R.G., Snippert, H.J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D.E., van Es, J.H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P.J., et al. (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459, 262–265.
- Satokata, I., a Maas, R. (1994). Msx1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nat. Genet.* 6, 348–356.
- Sauer, B., a Henderson, N. (1988). Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 5166–5170.
- Sculean, A., Chiantella, G.C., Windisch, P., a Donos, N. (2000). Clinical and histologic evaluation of human intrabony defects treated with an enamel matrix protein derivative (Emdogain). *Int J Periodontics Restorative Dent* 20, 374–381.
- Semina, E.V., Reiter, R., Leysens, N.J., Alward, W.L., Small, K.W., Datson, N.A., Siegel-Bartelt, J., Bierke-Nelson, D., Bitoun, P., Zabel, B.U., et al. (1996). Cloning and characterization of a novel bicoid-related homeobox transcription factor gene, RIEG, involved in Rieger syndrome. *Nat. Genet.* 14, 392–399.
- Seo, B.-M., Miura, M., Gronthos, S., Bartold, P.M., Batouli, S., Brahimi, J., Young, M., Robey, P.G., Wang, C.-Y., a Shi, S. (2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 364, 149–155.
- Seppala, M., Depew, M.J., Martinelli, D.C., Fan, C.-M., Sharpe, P.T., a Cobourne, M.T. (2007). Gas1 is a modifier for holoprosencephaly and genetically interacts with sonic hedgehog. *Journal of Clinical Investigation* 117, 1575–1584.
- Schmittgen, T.D., a Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 3, 1101–1108.
- Smith, B.H. (1989). Dental Development as a Measure of Life History in Primates. *Evolution* 43, 683.
- Snippert, H.J., Flier, L.G. van der, Sato, T., Es, J.H. van, Born, M. van den, Kroon-Veenboer, C., Barker, N., Klein, A.M., Rheenen, J. van, Simons, B.D., et al. (2010). Intestinal Crypt Homeostasis Results from Neutral Competition between Symmetrically Dividing Lgr5 Stem Cells. *Cell* 143, 134–144.
- Sonoyama, W., Liu, Y., Fang, D., Yamaza, T., Seo, B.-M., Zhang, C., Liu, H., Gronthos, S., Wang, C.-Y., Shi, S., et al. (2006). Mesenchymal Stem Cell-Mediated Functional Tooth Regeneration in Swine. *PLoS ONE* 1, e79.

- Spence, J.R., Mayhew, C.N., Rankin, S.A., Kuhar, M.F., Vallance, J.E., Tolle, K., Hoskins, E.E., Kalinichenko, V.V., Wells, S.I., Zorn, A.M., et al. (2011). Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature* 470, 105–109.
- Sternberg, N., a Hamilton, D. (1981). Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J. Mol. Biol.* 150, 467–486.
- Stockton, D.W., Das, P., Goldenberg, M., D’Souza, R.N., a Patel, P.I. (2000). Mutation of PAX9 is associated with oligodontia. *Nat. Genet.* 24, 18–19.
- Sullivan, K.M., Mannucci, A., Kimpton, C.P., a Gill, P. (1993). A rapid and quantitative DNA sex test: fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin. *BioTechniques* 15, 636–638, 640–641.
- Takahashi, K., a Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663–676.
- Termine, J.D., Belcourt, A.B., Christner, P.J., Conn, K.M., a Nylen, M.U. (1980). Properties of dissociatively extracted fetal tooth matrix proteins. I. Principal molecular species in developing bovine enamel. *J. Biol. Chem.* 255, 9760–9768.
- Thesleff, I. (1996). Two genes for missing teeth. *Nat. Genet.* 13, 379–380.
- Thesleff, I. (2003). Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. *J Cell Sci* 116, 1647–1648.
- Thesleff, I. (2006). The genetic basis of tooth development and dental defects. *Am. J. Med. Genet. A* 140, 2530–2535.
- Thesleff, I., a Jernvall, J. (1997). The enamel knot: a putative signaling center regulating tooth development. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 62, 257–267.
- Thesleff, I., Vaahtokari, A., a Partanen, A.M. (1995). Regulation of organogenesis. Common molecular mechanisms regulating the development of teeth and other organs. *Int. J. Dev. Biol.* 39, 35–50.
- Thesleff, I., Keränen, S., a Jernvall, J. (2001). Enamel knots as signaling centers linking tooth morphogenesis and odontoblast differentiation. *Adv. Dent. Res.* 15, 14–18.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., a Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145–1147.
- Thyagarajan, T., Sreenath, T., Cho, A., Wright, J.T., a Kulkarni, A.B. (2001). Reduced expression of dentin sialophosphoprotein is associated with dysplastic dentin in mice overexpressing transforming growth factor-beta 1 in teeth. *J. Biol. Chem.* 276, 11016–11020.
- Thyagarajan, T., Totey, S., Danton, M.J.S., a Kulkarni, A.B. (2003). Genetically Altered Mouse Models: the Good, the Bad, and the Ugly. *CROBM* 14, 154–174.

- Trumpp, A., Depew, M.J., Rubenstein, J.L., Bishop, J.M., a Martin, G.R. (1999). Cre-mediated gene inactivation demonstrates that FGF8 is required for cell survival and patterning of the first branchial arch. *Genes Dev.* *13*, 3136–3148.
- Tucker, A.S., Headon, D.J., Schneider, P., Ferguson, B.M., Overbeek, P., Tschopp, J., a Sharpe, P.T. (2000). Edar/Eda interactions regulate enamel knot formation in tooth morphogenesis. *Development* *127*, 4691–4700.
- Tucker, A.S., Headon, D.J., Courtney, J.-M., Overbeek, P., a Sharpe, P.T. (2004). The activation level of the TNF family receptor, Edar, determines cusp number and tooth number during tooth development. *Dev. Biol.* *268*, 185–194.
- Turecková, J., Sahlberg, C., Aberg, T., Ruch, J.V., Thesleff, I., a Peterkova, R. (1995). Comparison of expression of the *msx-1*, *msx-2*, *BMP-2* and *BMP-4* genes in the mouse upper diastemal and molar tooth primordia. *Int. J. Dev. Biol.* *39*, 459–468.
- Tureckova, J., Lesot, H., Vonesch, J.L., Peterka, M., Peterkova, R., a Ruch, J.V. (1996). Apoptosis is involved in the disappearance of the diastemal dental primordia in mouse embryo. *Int J Dev Biol* *40*:483–489.
- Vahtokari, A., Aberg, T., Jernvall, J., Keränen, S., a Thesleff, I. (1996). The enamel knot as a signaling center in the developing mouse tooth. *Mech. Dev.* *54*, 39–43.
- Vastardis, H. (2000). The genetics of human tooth agenesis: New discoveries for understanding dental anomalies. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* *117*, 650–656.
- Viriot, L., Lesot, H., Vonesch, J.L., Ruch, J.V., Peterka, M., a Peterková, R. (2000). The presence of rudimentary odontogenic structures in the mouse embryonic mandible requires reinterpretation of developmental control of first lower molar histomorphogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* *44*, 233–240.
- Viriot, L., Peterková, R., Peterka, M., a Lesot, H. (2002). Evolutionary implications of the occurrence of two vestigial tooth germs during early odontogenesis in the mouse lower jaw. *Connect. Tissue Res.* *43*, 129–133.
- Wakita, M., a Hinrichsen, K. (1980). Ultrastructure of the ameloblast-stratum intermedium border during ameloblast differentiation. *Acta Anat (Basel)* *108*, 10–29.
- Wang, X.-P., Suomalainen, M., Jorgez, C.J., Matzuk, M.M., Werner, S., a Thesleff, I. (2004). Follistatin regulates enamel patterning in mouse incisors by asymmetrically inhibiting BMP signaling and ameloblast differentiation. *Dev. Cell* *7*, 719–730.
- Wang, X.-P., Aberg, T., James, M.J., Levanon, D., Groner, Y., a Thesleff, I. (2005). *Runx2* (*Cbfa1*) inhibits *Shh* signaling in the lower but not upper molars of mouse embryos and prevents the budding of putative successional teeth. *J. Dent. Res.* *84*, 138–143.
- Wang, X.-P., O'Connell, D.J., Lund, J.J., Saadi, I., Kuraguchi, M., Turbe-Doan, A., Cavallero, R., Kim, H., Park, P.J., Harada, H., et al. (2009). *Apc* inhibition of Wnt signaling regulates supernumerary tooth formation during embryogenesis and throughout adulthood. *Development* *136*, 1939–1949.

- Warotayanont, R., Frenkel, B., Snead, M.L., a Zhou, Y. (2009). Leucine-rich amelogenin peptide induces osteogenesis by activation of the Wnt pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 387, 558–563.
- Witter, K., Lesot, H., Peterka, M., Vonesch, J.-L., Míšek, I., a Peterková, R. (2005). Origin and developmental fate of vestigial tooth primordia in the upper diastema of the field vole (*Microtus agrestis*, Rodentia). *Arch. Oral Biol.* 50, 401–409.
- Woodward, M.F., (1894). On the milk dentition of the Rodentia with a description of a vestigial milk incisor in the mouse (*Mus musculus*). *Anat Anz* 9:619–631.
- Yamashiro, T., Tummers, M., a Thesleff, I. (2003). Expression of bone morphogenetic proteins and *Msx* genes during root formation. *J. Dent. Res.* 82, 172–176.
- Yoshikawa, D.K., a Kollar, E.J. (1981). Recombination experiments on the odontogenic roles of mouse dental papilla and dental sac tissues in ocular grafts. *Arch. Oral Biol.* 26, 303–307.
- Zhang, Q., Murcia, N.S., Chittenden, L.R., Richards, W.G., Michaud, E.J., Woychik, R.P., a Yoder, B.K. (2003). Loss of the Tg737 protein results in skeletal patterning defects. *Developmental Dynamics* 227, 78–90.
- Zhang, Z., Lan, Y., Chai, Y., a Jiang, R. (2009). Antagonistic Actions of *Msx1* and *Osr2* Pattern Mammalian Teeth into a Single Row. *Science* 323, 1232–1234.
- Zhao, Z., Stock, D., Buchanan, A., a Weiss, K. (2000). Expression of *Dlx* genes during the development of the murine dentition. *Dev. Genes Evol.* 210, 270–275.